

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

EDUARDO FRIZZERA MEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *Eugenia uniflora* NA LESÃO
RENAL AGUDA EXPERIMENTAL**

VITÓRIA

2017

EDUARDO FRIZZERA MEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *Eugenia uniflora* NA LESÃO
RENAL AGUDA EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ágata Lages Gava

VITÓRIA
2017

EDUARDO FRIZZERA MEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *EUGENIA UNIFLORA* NA LESÃO
RENAL AGUDA EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 20 de dezembro de 2017.

Prof^a. Dr^a. Ágata Lages Gava – Orientadora, UFES

Prof Dr. Roger Lyrio, UFES

Prof. Dr. Leonardo dos Santos, UFES

Prof. Dr. Breno Valentim, UFES

Prof^a. Dra. Bianca Prandi Campagnaro, UVV

Vitória
2017

AGRADECIMENTOS

A Deus, nosso pai, e a seu filho Jesus, por sempre guiar nos caminhos corretos e estar presente nos momentos em que mais precisamos.

Aos meus avós, Vanda e Riva (in memorin), por toda a educação e ensinamentos com os quais me criaram.

Aos meus pais pelo incentivo ao estudo e por nunca permitir que eu desistisse dos meus sonhos e ao meu irmão Guilherme por todo o apoio.

A minha orientadora e grande amiga Ágata Lages Gava, pelos conselhos, orientações e ensinamentos que foram muito importantes nessa caminhada de estudos, muito obrigado pelas oportunidades e pelas lutas.

À Fabiana e o meu filho Pedro, por todo amor, compreensão e incentivo. Vocês sempre foram e serão muito importantes na minha vida. Não posso esquecer da minha princesa Maria Eduarda que ajudou no processo de finalização da tese.

Aos professores Vasquez e Silvana, por me receberem no laboratório. Obrigado pela paciência, pelas discussões de ideias, pelo apoio e pelos ensinamentos.

Ao professor Marcelo Baldo pelo incentivo e ajuda no início da caminhada rumo ao doutorado

Muito obrigado os colegas da Pós-Graduação, Ananda, Marcos pois sem eles a vida no laboratório não teria graça. Ainda aos colegas: Simone, Fabrício, Gustavo, Thiago Menezes, Marcela, Rafaela, Jamila, Paula, Elis pois ajudaram muito no desenvolvimento do trabalho.

Aos professores da pós-graduação em Ciências Fisiológicas, por todos os conhecimentos transmitidos, que foram de particular importância para realização deste trabalho.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Figura da pitangueira e de seus frutos	18
Figura 2: Avaliação dos efeitos do tratamento Extrato de <i>Eugenia</i> uniflora sobre a taxa de filtração glomerular	33
Figura 3: Avaliação dos efeitos do tratamento Extrato de <i>Eugenia</i> uniflora sobre o fluxo plasmático renal.....	34
Figura 4: Avaliação dos efeitos do tratamento Extrato de <i>Eugenia</i> uniflora fluxo sanguíneo renal.....	35
Figura 5: Avaliação dos efeitos do tratamento Extrato de <i>Eugenia</i> uniflora fluxo plasmático renal.	36
Figura 6: Avaliação dos efeitos do tratamento Extrato de <i>Eugenia</i> uniflora sobre a produção de ânion superóxido..	37
Figura 7: Avaliação dos efeitos do tratamento Extrato de <i>Eugenia</i> uniflora sobre a produção de peróxido de hidrogênio..	38
Figura 8: Avaliação dos efeitos do tratamento Extrato de <i>Eugenia</i> uniflora sobre a produção de peroxinitrito e hidroxila.....	39
Figura 9: Avaliação da capacidade enzimática antioxidante de células renais.	41
Figura 10: Análise por Western blot das enzimas SOD e Catalase em tecido renal dos animais tratados e não tratados com EU.....	42
Figura 11: Avaliação das principais fontes de produção de espécies reativas de oxigênio em células de tecido renal..	44
Figura 12: Avaliação de apoptose por citometria de fluxo	46
Figura 13: Análise de regressão linear e correlação entre apoptose e produção de espécies reativas de oxigênio.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da LRA de acordo com os critérios KDIGO. Adaptado de “KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury”, 2012.	12
Tabela 2: Prospecção fitoquímica qualitativa do extrato obtido das folhas de E. uniflora (EU).	32

RESUMO

A lesão renal aguda (LRA) é caracterizada por um rápido e potencialmente reversível declínio na função renal; no entanto, o tratamento atual da LRA não é específico e está associado a cuidados de suporte limitados. Considerando a necessidade de novas abordagens terapêuticas, acreditamos que o extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* (pitanga) por possuir propriedades antioxidantes, pode ser benéfico para o tratamento da LRA induzida por isquemia/reperfusão renal (I/R).

O extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* (200mg/kg, oral) ou veículo (salina 0,9%) foram administrados a ratos Wistar anteriormente à indução da isquemia renal bilateral (45 minutos). Após 24 horas de reperfusão, os *clearances* de inulina e paraminohipurato foram realizados para determinar a taxa de filtração glomerular (TFG), o fluxo plasmático renal (FPR), o fluxo sanguíneo renal (FSR) e a resistência vascular renal (RVR). A produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, peroxinitrito, radical hidroxil, atividade das enzimas oxidantes e antioxidantes e apoptose nos rins foram avaliados por citometria de fluxo. As avaliações da expressão das enzimas antioxidantes foram realizadas através da técnica de Western blot.

A I/R resultou em TFG, FPR e FSR diminuídos e aumentou a RVR, porém, estes parâmetros foram melhorados em ratos que receberam o extrato. O tratamento com extrato de *Eugenia uniflora* resultou em diminuição no estresse oxidativo e aumento da atividade e das expressões das enzimas antioxidantes e uma diminuição da apoptose nos rins de ratos submetidos à I/R.

Nossos dados mostraram que o extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* possa ser capaz de prevenir ou atenuar a perda de função renal induzida pela isquemia reperfusão através da diminuição do stress oxidativo e apoptose, fornecendo assim informações valiosas que poderão subsidiar a incorporação de fitoterápicos no SUS.

ABSTRACT

Acute kidney injury (AKI) is characterized by a rapid and potentially reversible decline in renal function; however, the current treatment of AKI is not specific and is associated with limited supportive care. Considering the need for new therapeutic approaches, we believe that the hydroalcoholic extract of leaves of *Eugenia uniflora* (pitanga) because of its antioxidant properties, may be beneficial for the treatment of RAI induced by renal ischemia / reperfusion (I / R).

Hydroalcoholic extract from *Eugenia uniflora* leaves (200mg / kg, oral) or vehicle (0.9% saline) was administered to Wistar rats prior to the induction of bilateral renal ischemia (45 minutes). After 24 hours of reperfusion, clearances of inulin and paraminothiazurate were performed to determine the glomerular filtration rate (GFR), renal plasma flow (RPF), renal blood flow (RBF) and renal vascular resistance (RVR). The production of superoxide anion, hydrogen peroxide, peroxynitrite, hydroxyl radical, activity of oxidant enzymes and antioxidants and apoptosis in the kidneys were evaluated by flow cytometry. Evaluations of the expression of the antioxidant enzymes were performed by the Western blot technique.

I / R resulted in reduced TFG, FPR and FSR and increased RVR, but these parameters were improved in rats receiving the extract. Treatment with *Eugenia uniflora* extract resulted in a decrease in oxidative stress and an increase in the activity and expression of antioxidant enzymes and a decrease in apoptosis in the kidneys of rats submitted to I / R.

Our data showed that the hydroalcoholic extract of leaves of *Eugenia uniflora* may be able to prevent or attenuate the loss of renal function induced by ischemia reperfusion through the reduction of oxidative stress and apoptosis, thus providing valuable information that may subsidize the incorporation of herbal medicines into SUS .

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO	11
1.1 Lesão renal aguda	11
1.1.1 Fisiopatologia.....	13
1.1.2 Manejo clínico da LRA	16
1.2 <i>Eugenia uniflora</i>	17
2) JUSTIFICATIVA	20
3) OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivo Específico	21
4.0 METODOLOGIA.....	22
4.1 Coleta do material vegetal e preparo do extrato.....	22
4.2 Prospecção fitoquímica do extrato	22
4.3 Animais experimentais	23
4.4 Grupos experimentais.....	23
4.5 Indução da lesão renal aguda	24
4.6 Protocolo de Função Renal	24
4.7 Isolamento de células renais	26
4.9 Detecção de espécies altamente reativas de oxigênio	28
4.10 Detecção de óxido nítrico.....	28
4.11 Determinação dos níveis das enzimas antioxidantes por <i>WESTERN BLOT</i>	29
4.12 Avaliação das vias pró-oxidantes e antioxidantes	30
5.0 RESULTADOS	32
5.1 Etapa Botânica.....	32
5.2 Etapa química.....	32
5.2.1 Taxa de Filtração Glomerular	33
5.2.2 Fluxo plasmático renal.....	34
5.2.3 Fluxo sanguíneo renal	35
5.2.4 Resistência vascular renal.....	36
5.3 Avaliação do Estresse Oxidativo	37
5.3.1 Ânion Superóxido	37
5.3.2 Peróxido de hidrogênio	38
5.3.3 Radical hidroxila e ânion peroxinitrito	39

5.3.4	Avaliação do sistema antioxidante no tecido renal	40
5.3.5	Avaliação da participação das principais vias de produção de espécies reativas de oxigênio	43
5.4	Avaliação da apoptose.....	45
6.0	DISCUSSÃO	48
7.0	SUMARIZANDO OS RESULTADOS	59
8.0	CONCLUSÃO	60
9.0	REFERÊNCIAS	61

1) INTRODUÇÃO

1.1 Lesão renal aguda

A lesão renal aguda (LRA) possui como característica o declínio da taxa de filtração glomerular (TFG) e retenção de resíduos de compostos nitrogenados. (SINGH et al., 2012). Outras manifestações clínicas e laboratoriais incluem a diminuição da produção de urina (nem sempre presente), acúmulo de metabólitos ácidos e aumento de sódio e potássio no plasma. (BELLOMO; KELLUM; RONCO, 2012) O prejuízo resultante da LRA é a incapacidade dos rins desenvolverem suas funções como: manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico, controle da osmolaridade e dos volumes dos compartimentos corporais, manutenção do equilíbrio ácido-base e das funções endócrinas. (BARROS, 2013).

Devido ao desenvolvimento de estudos na área de nefrologia, foi adotado para definição de insuficiência renal aguda o termo “lesão renal aguda” (LRA). (BELLOMO; KELLUM; RONCO, 2012). Ainda, de acordo com KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury, é caracterizada uma lesão renal aguda quando o paciente apresenta um aumento de creatinina sérica maior que 0,3 mg/dL em 48 horas, ou aumento da creatinina sérica em mais 1,5 vezes o valor basal em menos de 7 dias, ou volume urinário menor que 0,5ml/Kg/h em 6 horas (KELLUM et al., 2012)

A LRA pode provocar um dano contínuo dos rins, portanto existem critérios de classificação para os diferentes estágios da doença. Assim, o método de classificação mais recente e utilizado na clínica é o de *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) (tabela 01) o qual é baseado na combinação de critérios de vários métodos já aplicados na clínica com algumas modificações.

Tabela 1: Classificação da LRA de acordo com os critérios KDIGO. Adaptado de “KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury”, 2012.

Estágio	Creatinina Plasmática	Produção de Urina
1	1,5 a 1,9 vezes o basal ou aumento $\geq 0,3$ mg/dL	$<0,5$ mL/kg/h por 6-12 horas
2	2,0 a 2,9 vezes o basal	$<0,5$ mL/kg/h por ≥ 12 horas
3	3,0 vezes o basal; ou aumento $\geq 0,4$ mg/dL; ou se <18 anos, TFG ≤ 35 mL/min/1,73 m ² ; ou início da terapia de substituição renal	$<0,3$ mL/kg/h por ≥ 24 horas ou anúria por ≥ 12 horas

A LRA é uma doença com grande incidência em pacientes hospitalizados ao redor do mundo. Nos Estados Unidos a incidência de LRA nos hospitais aumentou de 4,9% para 7,2% em 17 anos (NASH; HAFEEZ; HOU, 2002), já na Austrália um estudo de coorte demonstrou uma incidência de 18% dessa doença com uma piora do estado de saúde do paciente evoluindo para óbito (UCHINO et al., 2006). Segundo estudo feito por Ricci e Ronco, a LRA possui uma incidência de 0,25% na população geral, de 18% em pacientes hospitalizados e de 30 a 60% em pacientes em estado crítico (RICCI; RONCO, 2012). Já outro estudo evidencia que LRA acomete um de cinco adultos e um de três crianças hospitalizadas com doenças agudas. (REWA; BAGSHAW, 2014)

Apesar dos dados epidemiológicos serem de países desenvolvidos, a LRA é cada vez mais reconhecida como um fator de morbidade, mortalidade e prejuízo econômico principalmente para países em desenvolvimento (LI; BURDMANN; MEHTA, 2013). Nos países em desenvolvimento, a LRA comporta-se de forma bimodal. Nos grandes centros urbanos e modernos os padrões dos pacientes com essa doença são semelhantes aos pacientes dos países desenvolvidos:

possui predominância de uma doença adquirida em hospital em pacientes com insuficiência multiorgânica sendo a principal causa da LRA a isquemia renal associada por sepsies ou por drogas nefrotóxicas. Já nas áreas rurais ou cidades menores a LRA está associada com uma doença adquirida na comunidade acometendo jovens previamente saudáveis. Entre as doenças que podem levar um dano renal pode-se destacar: doenças infecciosas (malária, dengue, febre amarela, leptospirose, tétano e vírus da imunodeficiência humana), venenos animais (cobras, abelhas, aranhas *Loxosceles*, lagartas *Lonomia*), aborto, corantes e medicamentos naturais. Todas essas doenças estão associadas à pobreza a qual está ligada a falta de saneamento básico, precariedade na educação e na carência no acesso de infraestrutura urbana adequada e ainda, uma dificuldade ao acesso aos serviços de saúde. (LI; BURDMANN; MEHTA, 2013; LOMBARDI et al., 2008)

No Brasil, um estudo realizado no hospital escola do município de São Paulo entre os anos de 2005 a 2006 apresentou 76% dos pacientes com LRA, sendo esses submetidos a tratamento dialítico de hemodiálise nas UTIs (SECCO; CASTILHO, 2007). Os óbitos devido à LRA possuem números expressivos. Segundo DATASUS, em 2015 o Brasil apresentou uma mortalidade de 4.525 pacientes sendo as regiões nordeste (1.238) e sudeste (1.951) com os maiores casos de óbitos. (BRASIL DATASUS, 2015).

Assim, a LRA possui um grande impacto na saúde, sendo ela um fator de morbidade e mortalidade para os pacientes internados bem como promovendo um aumento de custos econômicos advindos de um aumento do tempo de internação elevando os gastos com recursos de saúde.

1.1.1 Fisiopatologia

A LRA é um processo multifatorial dentre os quais pode-se destacar a isquemia e reperfusão, caracterizado por uma diminuição do fluxo sanguíneo para o rim, seguido de uma restauração do fluxo e do suprimento de oxigênio. Essa restrição de fluxo sanguíneo promove uma diminuição da oferta de oxigênio e o

fornecimento de nutrientes aos néfrons e o aumento da demanda energética com depleção de ATP. Como consequência dessas ações, ocorre o acúmulo intracelular de cálcio e de espécies reativas de oxigênio, infiltração de células inflamatórias e ativação de vias apoptóticas. (MAKRIS; SPANOU, 2016; ZAHARAN et al., 2015b)

A organela que mais é atingida pela diminuição dos níveis de oxigênio é a mitocôndria. Portanto, estruturas como túbulos contorcidos proximais são mais sensíveis à lesão renal do que outros segmentos do néfrons pois essas estruturas são mais dependentes do ATP mitocondrial. (WEINBERG, 1991). Ainda, com o esgotamento do ATP, ocorre o prejuízo do funcionamento da bomba Ca^{2+} /ATPase a qual é responsável pela retirada do excesso de cálcio citosólico. O acúmulo desse íon no citoplasma ativa fosfolipases e proteases promovendo um aumento ainda na permeabilidade da membrana, com consequente influxo maior de Ca^{2+} para os compartimentos citoplasmáticos e mitocondriais, levando a lesão celular irreversível. (TUCCI JR. et al., 2005)

Assim como a isquemia gera danos graves ao funcionamento renal, a reperfusão também participa de maneira significativa na LRA pois, durante a fase de reperfusão ocorre a produção das espécies reativas de oxigênio (ERO) que promovem a peroxidação lipídica gerando assim danos na membrana celular. Além disso, as EROs podem causar danos oxidativos em proteínas e no DNA contribuindo para apoptose e morte celular. Além disso, na LRA ocorre um downregulation das enzimas antioxidantes, o que pode ser responsável pelo aumento da lesão renal. Ainda no processo de isquemia/reperfusão, ocorre um aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Trabalhos demonstram que o aumento dessa enzima agrava ainda mais a lesão renal aguda. (KORKMAZ; KOLANKAYA, 2013; MALEK; NEMATBAKHSH, 2015)

Outra via que participa na patogênese da LRA é o sistema renina angiotensina. A ativação desse sistema promove o aumento da angiotensina II, piorando a lesão renal pois causa um aumento na constrição dos vasos renais e uma elevação da sensibilidade vascular à estimulação simpática, além de gerar estresse oxidativo e induzir a apoptose. (IWAI; HORIUCHI, 2009; KIM et al., 2012)

Devido ao processo de lesão renal aguda ser multifatorial a atuação da via inflamatória também contribui para o avanço da doença pois, vários tipos celulares desempenham um papel importante na sua fisiopatologia. A inflamação que acontece durante a LRA está envolvida com um aumento de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), cuja produção é induzida pelo infiltrado mononuclear e pelas células endoteliais. Também ocorre um grande aumento da síntese de leucotrienos e da atividade da ciclooxigenase. (MALEK; NEMATBAKHS, 2015; PATEL et al., 2004)

O processo de apoptose que acontece na LRA em parte é devido a fragmentação de DNA, entretanto, a ação das vias inflamatórias também contribui para o avanço da apoptose a qual pode ocorrer de duas formas. Pela via intrínseca, estresses intra ou extracelulares geram sinais que interagem com membros anti ou pró-apotóticos da mitocôndria, reduzindo a permeabilidade da membrana e levando à liberação do citocromo c e outros fatores indutores de apoptose ativando as caspases. Pela via extrínseca, a ligação de fatores específicos, como o TNF- α , à superfície celular ativa a cascata de caspases, levando à morte celular. (PRICE; SAFIRSTEIN; MEGYESI, 2009; SABBAHY; VAIDYA, 2011).

O manejo atual da lesão renal aguda é não específico e associado a cuidados de suporte limitados, assim estudos de novas abordagens são necessários (FURUICHI et al., 2012). Atualmente a prevenção é a melhor maneira de melhorar os resultados em pacientes críticos com disfunção renal. Entre estas formas de prevenção podemos citar o uso de cristaloides isotônicos para expansão de volume intravascular em pacientes de risco com lesão renal aguda e o uso de vasopressores em conjunto com fluidos em pacientes com choque vasomotor com risco de lesão renal aguda.

1.1.2 Manejo clínico da LRA

Na clínica, a melhor maneira de aprimorar os resultados dos pacientes críticos com disfunção renal é a prevenção. Entre as formas de prevenção podemos citar o uso de cristaloides isotônicos para expansão de volume intravascular em pacientes de risco com LRA e o uso de vasopressores em conjunto com fluidos em pacientes com choque vasomotor com risco de LRA. (KELLUM; LAMEIRE, 2013). O uso de diuréticos de alça era muito empregado na clínica como forma de prevenção pois acreditavam que poderia reduzir o trabalho metabólico os túbulos e ainda diminuir a concentração de toxinas nos túbulos. (STAR, 1998) Um outro estudo demonstrou que os diuréticos seriam usados como forma de tratamento e não prevenção da LRA pois eles poderiam gerenciar a sobrecarga de volume e otimizar o equilíbrio ácido-base e a homeostase de eletrólitos. (“KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury”, 2012; RICCI; RONCO, 2012). Entretanto, dados epidemiológicos sugerem que os diuréticos de alça podem aumentar a mortalidade de pacientes portadores de doenças graves com LRA. Em 2013 a “KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury” sugeriu não utilizar os diureticos de alça para tratamentos de LRA exceto nos casos de manejo de sobre carga de volume. (KELLUM; LAMEIRE, 2013)

Outros fármacos com potenciais ações terapêuticas no tratamento da LRA seriam os vasodilatadores, como dopamina e fenoldopam. Apesar destes fármacos já terem sido utilizados na clínica como forma de tratamento para a LRA, alguns estudos demonstraram a existência de efeitos adversos. O Guia de Práticas Clínicas para Lesão Renal Aguda recomenda o abandono do uso destas drogas vasodilatadoras exclusivamente para tratamento e prevenção da LRA. (“KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury”, 2012; KELLUM; LAMEIRE, 2013)

Os peptídeos natriuréticos também poderiam ser terapias interessantes para o tratamento da LRA uma vez que são bons vasodilatadores. Entretanto, o dado da literatura sobre o uso desses fármacos é contraditório. Sendo assim, o Guia de Práticas Clínicas para Lesão Renal Aguda recomenda não utilizar esse fármaco para tratamento e nem prevenção da LRA. (KELLUM; LAMEIRE, 2013)

Diversas drogas para tratar a LRA têm sido testadas nos últimos anos, como por exemplo teofilina e o fator de crescimento semelhante a insulina-1, porém sem sucesso e nenhuma medicação específica está disponível na prática clínica, sendo necessária a pesquisa de novos fármacos que possam efetivamente tratar a doença.(KELLUM; LAMEIRE, 2013)

1.2 *Eugenia uniflora*

O uso de plantas com ação terapêutica tem origem histórica sendo utilizada como chás, tinturas e outras formulações e seu conhecimento popular passado verbalmente. (BALUNAS; KINGHORN, 2005) Uma parte dos medicamentos comercializados no mundo são de origem de produtos naturais. Entre os anos de 2001 a 2002 um quarto dos medicamentos mais vendidos mundialmente eram obtidos de fontes naturais (AGARWAL et al., 2009) .

Diante do enorme potencial de descoberta de fármacos ante os produtos naturais, em 2008 o Ministério da Saúde lançou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), se embasando em uma lista de espécies vegetais com uso consagrado já nos serviços de saúde, no conhecimento popular e em estudos químicos e farmacológicos. Essas espécies têm alto potencial de gerar produtos de interesse ao SUS e por isso, avançar nas etapas da cadeia produtiva (BRASIL, 2012).

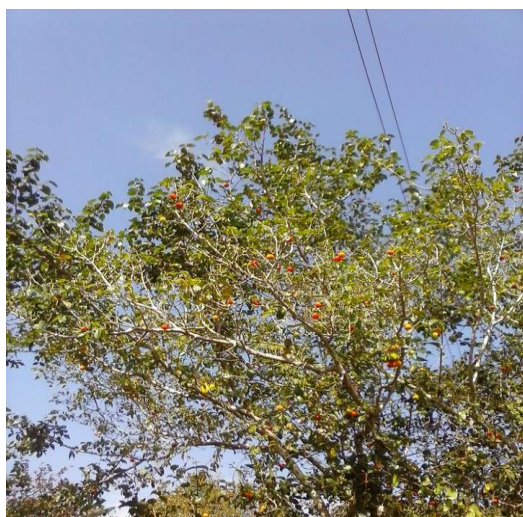
A *Eugenia uniflora* é uma planta amplamente distribuída no Brasil e em alguns países da América do Sul e tem sido utilizada na medicina popular para tratar uma série de desordens (PIO CORRÊA; PENA, 1984; SIMÕES, 1998). Tem como nome popular Pitangueira, Cerejeira-brasileira, Ginja, Pitanga-branca, Pitanga-do-mato, Pitanga-rósea, Pitanga-roxa, Pitangueira-miúda, Pitangueira-vermelha, Pitanga-vermelha, Pitangueira-comum, dentre outros (TATIANA S. FIUZA, MARIA HELENA REZENDE, SIMONE M. T. SABÓIA-MORAIS, MARIA TERESA F. BARA, LEONICE M. F. TRESVENZOL, 2008).

O gênero *Eugenia* é um dos maiores da família Myrtaceae, com mais de 500 espécies, das quais cerca de 400 encontram-se no Brasil e assumem destaque especial por serem utilizadas como plantas medicinais. Acredita-se que *E. uniflora* tenha sido introduzida na medicina empírica pelos índios Guaranis no século XV (Alonso, 1998). Infusões das folhas desta planta são usadas como

anti-hipertensivo e diurético (AMAT; VAJIA, 1991) bem como para o tratamento de desordens digestivas (BANDONI et al., 1972; RATERA, E.E., RATERA, 1980), como antipirético e antirreumático (ALICE et al., 1991).

A *Eugenia uniflora* (Pitangueira), apresenta-se na forma de árvore semidecídua ou arbusto, atingindo de 4 a 10 m de altura, copa estreita, de tronco liso de cor pardo clara. Suas folhas são simples, cartáceas, de 3 a 7 cm de comprimento, com aroma característico. (TATIANA S. FIUZA, MARIA HELENA REZENDE, SIMONE M. T. SABÓIA-MORAIS, MARIA TERESA F. BARA, LEONICE M. F. TRESVENZOL, 2008)

A)



B)



Figura 1: A) Pitangueira que foi coletada as folhas B) frutos da pitangueira –
Fonte: arquivos pessoais do autor

Seus frutos são comestíveis, sendo muito apreciada e conhecida no Brasil. Tem seu uso muito disseminado na medicina popular, porém sua investigação química realizada até então é muito limitada. Devido as propriedades benéficas à saúde atribuídas as folhas, o estudo foi realizado pelas mesmas, pois estas já são largamente utilizadas na medicina popular para inúmeras patologias. Além disso, ações benéficas tais como atividade anti-inflamatória, hipotensora, diurética, inibidora do aumento de triglicerídeos séricos e da glicose estão sendo estudadas. (BAGETTI et al., 2011). Além disto, compostos fitoquímicos presentes na Pitanga, como antocianinas, carotenóides e polifenóis

desempenham várias atividades benéficas à saúde, como o combate a doenças cardiovasculares e ao câncer.

Alguns estudos têm confirmado as bases farmacológicas para o uso popular da *Eugenia uniflora* (Myrtaceae). Estudos já demonstraram que diferentes extratos de *Eugenia uniflora* melhoram a hiperglicemia e hipertrigliceridemia em camundongos (ARAI et al., 1999), além de ter atividade sobre o metabolismo lipídico (FERRO et al., 1988). Também foi demonstrado que a planta tem propriedades diuréticas (SCHAPOVAL et al., 1994) e atividade inibitória sobre a xantina-oxidase (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987). Com relação às propriedades anti-inflamatórias desta planta, esta parece possuir efeitos benéficos sobre a inflamação. Extratos de folhas de *Eugenia uniflora* apresentam alta propriedade anti-inflamatória (SCHAPOVAL et al., 1994) e o suco da pitanga é capaz de reduzir a produção de IL-8 em células epiteliais de gengiva (JOSINO SOARES et al., 2014). De acordo com estes dados, a utilização de outras plantas do mesmo gênero, como a *Eugenia punicifolia* e *Eugenia jambolana* também parecem exercer atividade anti-inflamatória (BASTING et al., 2014; EL-SHENAWY, 2009).

As plantas do gênero *Eugenia* também parecem ser capazes de reduzir apoptose e o stress oxidativo. Um estudo realizado por Ghosh et al (2016) demonstrou que a *Eugenia jambolana* reduziu a apoptose normalizou a expressão de Bax, Bcl-2, caspase-9, caspase-3 e catalase em ratos diabéticos. (GHOSH et al., 2016) Estudos in vitro demonstraram que a polpa da fruta de *Eugenia jambolana* protegeu as células contra os danos ocasionados pelo tratamento com peróxido de hidrogênio. A melhora incluiu aumento na expressão da glutathione peroxidase e capacidade antioxidante total, além de reduzir a expressão de moléculas envolvidas no processo apoptótico, como caspase-3, caspase-8, Fas e caspase-9 (GARCIA MDEL; GODOY; CELUCH, 2013).

2) JUSTIFICATIVA

O presente estudo se dá pela importância clínica e epidemiológica da lesão renal aguda no contexto das doenças renais e pela ausência de terapias efetivas que possam prevenir e/ou tratar e/ou retardar a progressão desta doença. Considerando que a *Eugenia uniflora* parece reduzir o stress oxidativo, a inflamação e apoptose, fatores estes que estão diretamente envolvidos na progressão da lesão renal aguda, acreditamos que a utilização do extrato de *Eugenia uniflora* possa ter efeitos benéficos sobre esta doença.

Portanto, a elucidação dessas propriedades da *Eugenia uniflora*, pode fornecer informações valiosas que poderão subsidiar a incorporação de fitoterápicos no SUS, e contribuir com o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos pela população brasileira. Além disso, o uso racional de plantas medicinais pode constituir uma terapia coadjuvante ou preventiva para as doenças renais

3) OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora* em ratos Wistar com LRA

3.2 Objetivo Específico

- Realizar a identificação fitoquímica qualitativa do extrato vegetal
- Avaliar se o extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora* é capaz de prevenir/atenuar a lesão renal aguda induzida pela isquemia reperfusão renal através da determinação de parâmetros de função e hemodinâmica renal, tais como taxa de filtração glomerular, fluxo plasmático e sanguíneo renal e resistência vascular renal;
- Verificar se o extrato aquoso de *Eugenia uniflora* previne/atenua o aumento do stress oxidativo induzido pela isquemia reperfusão renal;
- Avaliar o potencial anti-apoptótico do extrato aquoso de *Eugenia uniflora*;

4.0 METODOLOGIA

4.1 Coleta do material vegetal e preparo do extrato

As folhas de *Eugenia uniflora* foram coletadas de plantas adultas e sadias. Uma exsicata da porção fértil foi armazenada no Herbário Central da UFES (VIES) para documentação. Após coleta, o material vegetal foi submetido à secagem em estufa de ar circulante a 45°C, durante 7 dias. O material desidratado foi pulverizado em moinhos de facas para produção de um pó, o qual foi submetido ao processo de extração por remaceração em etanol 95% (1:5 p/v, 75h, 3 repetições). A mistura foi filtrada em papel filtro e as soluções extrativas foram concentradas sob pressão reduzida e liofilizadas até a obtenção de um extrato seco.

4.2 Prospeção fitoquímica do extrato

Após a extração, a solução extrativa foi concentrada sob pressão reduzida no rotaevaporador (Heidolph, Laborota-4000), em temperatura inferior a 50 °C. Em seguida, transferido para vidro tarado e submetido à liofilização (Liotop, L101) para completa remoção de água e resíduos de solvente orgânico. Os extratos obtidos permaneceram armazenados em freezers, constituindo um banco de extratos no DFN/CCA-UFES.

O extrato obtido foi inicialmente submetido à prospeção fitoquímica qualitativa, a fim de obter informações preliminares acerca dos principais grupos de metabólitos secundários presentes (MATOS, 2009; WAGNER; BLADT; ZGAINSKY, 1984). Foram pesquisadas a presença de compostos fenólicos, realizada por meio de reação de complexação de FeCl₃; Flavonoides, através da reação de Shinoda (presença de ácido) e de Pew (para pesquisa da presença de diidroflavonol); Taninos, pelos testes com gelatina, acetato de chumbo (pesquisa de taninos hidrolisáveis) e acetato de cobre (taninos condensados); Cumarinas pela reação com KOH; Terpenos, Glicosídeos Cardiotônicos e esteroides, reação com ácido fosfórico (Pesez) e Kedde; Alcalóides com reagente de Mayer e Wagner e por último Saponinas.

4.3 Animais experimentais

Neste estudo foram utilizados Wistar, machos (80-100g), fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em condições controladas e estáveis em biotério (temperatura 22o C, umidade de 50-70% e ciclo claro-escuro de 12/12horas) e tiveram livre acesso à água e ração. A criação e o manuseio de animais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO) e sociedades de biologia e fisiologia experimentais. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais sob o número 73/2016

4.4 Grupos experimentais

O presente estudo contou com os seguintes grupos experimentais:

- a) Sham + veículo (Sham+VC): animais que receberam o veículo do extrato de *Eugenia uniflora* (salina + Twin 1%, 1mL), por gavagem, durante 28 dias e foram submetidos a cirurgia sham ao fim do tratamento.
- b) Sham + *Eugenia uniflora* (Sham+EU): animais que receberam o tratamento com o extrato aquoso de *Eugenia uniflora* (200mg/Kg peso corporal), por gavagem, durante 28 dias e foram submetidos a cirurgia sham ao fim do tratamento.
- c) Lesão renal aguda + veículo (I/R+VC): animais que receberam o veículo do extrato de *Eugenia uniflora* (salina + Twin 1%, 1mL), por gavagem, durante 28 dias e foram submetidos a cirurgia para indução da LRA ao fim do tratamento.
- d) Lesão renal aguda + *Eugenia uniflora* (I/R+EU): animais que receberam o tratamento com o extrato aquoso de *Eugenia uniflora* (200mg/Kg peso corporal), por gavagem, durante 28 dias animais e foram submetidos a cirurgia para indução da LRA ao fim do tratamento.

4.5 Indução da lesão renal aguda

A indução da lesão renal aguda foi realizada através da cirurgia de isquemia reperfusão renal. Para tanto, os animais foram anestesiados com ketamina (91 mg/kg) e xilazina (9,1 mg/kg) por via intraperitoneal e posicionados em decúbito dorsal. Após a tricotomia foi realizada uma incisão abdominal e a artéria renal foi exposta e amarrada com linha cirúrgica, interrompendo suprimento de sangue aos rins. Após 45 minutos de isquemia bilateral a linha foi removida e o fluxo sanguíneo para os rins, reestabelecido (BETZ et al., 2012a; SIVARAJAH, 2003). Em sequência, a camada muscular e a incisão cutânea foram suturadas. Os animais do grupo Sham foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, exceto pela ligadura da artéria renal.

Após a cirurgia, os animais receberam injeção subcutânea de 1 mL de NaCl 0,9% para prevenir desidratação e mantidos em observação até se recuperarem da anestesia (BETZ et al., 2012a)

4.6 Protocolo de Função Renal

Vinte e quatro horas após o início da reperfusão renal ou cirurgia Sham, a determinação dos parâmetros de taxa de filtração glomerular, fluxo plasmático e sanguíneo renal e resistência vascular renal foi realizado utilizando-se o clearance de inulina e para-aminohipurato. Para tanto, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg i.p.) e tiveram sua traquéia cateterizada (PE-240) para facilitar a respiração. A artéria carótida direita (PE 50), a veia jugular esquerda (PE 50) e bexiga (PE 320) dos animais foram cateterizadas para coleta de sangue, infusão de inulina e para-aminohipurato e coleta de urina, respectivamente. O volume urinário foi determinado gravimetricamente. Os animais foram infundidos durante o experimento com uma solução salina isotônica com manitol a 3% a uma velocidade de 0,06 mL/min mediante uma bomba de infusão contínua. Após a preparação do animal foi administrada por via intravenosa uma dose prime de inulina e paraaminohipurato (30mg/100g de peso corporal de inulina e 0,6mg/100g de peso corporal de PAH) e após este procedimento, teve início a infusão de manutenção destas

substâncias. Após um período de estabilização de 30 minutos, foram realizados 4 períodos de coleta de urina de 30 minutos, seguidas por coletas de sangue.

A determinação dos valores plasmáticos e urinários de inulina foi realizada através da utilização do método modificado de Fuhr (1955) e a quantificação dos valores plasmáticos e urinários de paraaminohipurato foi realizada através do método modificado de Fuhr (FUHR; KACZMARCZYK; KRUTTGEN, 1955). Utilizando-se do fluxo urinário e quantificação dos valores plasmáticos e urinários de inulina e para-aminohipurato, foram calculadas as suas taxas de depuração, que refletem a taxa de filtração glomerular (TFG) e o fluxo plasmático dos animais (FPR), respectivamente segundo a seguinte fórmula:

$$Cl = \frac{\left(\frac{[X_u] \times [F_u]}{X_p} \right)}{P} \quad (1)$$

Onde:

- Cl = clearance da substância (inulina ou PAH) normalizado pelo peso corpóreo do animal;
- X_u = concentração da substância na urina;
- X_p = concentração da substância no plasma;
- F_u = fluxo urinário;
- P = massa corporal do animal (kg).

Um capilar heparinizado foi preenchido de sangue para quantificação do hematócrito, o que permitiu o cálculo do fluxo sanguíneo renal (FSR) através da fórmula: $FSR = FPR/(1\text{-hematócrito})$.

Durante o tempo supracitado, a pressão arterial média dos animais (PAM) foi continuamente registrada através da utilização de um transdutor de pressão conectado a um sistema de aquisição de dados. A resistência vascular renal (RVR) foi então determinada matematicamente através da lei de Ohm, onde a $RVR = PAM/FSR$.

4.7 Isolamento de células renais

Células renais foram isoladas conforme técnica padronizada (DIAS et al., 2014; FOLKMANN; LOFT; MØLLER, 2007) e utilizadas posteriormente nas análises por citometria de fluxo. Para tanto, os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Hepes, coletados, divididos em córtex e medula, triturados com uma tesoura cirúrgica e incubados em solução de extração contendo 25% de Tripsina em EDTA por 30 minutos a 37°C para dissociação das células. Logo depois o extrato de células foi filtrado através de uma membrana de nylon (BD falcon 70 µm) para remover os resíduos celulares e as amostras foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS) para remoção das enzimas. As células foram armazenadas a -80°C em solução contendo 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) em soro fetal bovino (SFB) até posterior análise.

4.8 Detecção de espécies reativas de oxigênio

A análise de ROS foi realizada por citometria de fluxo conforme descrito anteriormente (CAMPAGNARO et al., 2013; TONINI et al., 2013). Dihidroetídio (DHE) e diacetato de 2'7'diclorofluoresceína (DCF-DA) foram usados para detectar ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) intracelular, respectivamente. Devido a sua capacidade de penetrar livremente as membranas celulares, o DHE é amplamente utilizado para monitorar a produção de $\bullet\text{O}_2^-$. Após reação com $\bullet\text{O}_2^-$, o DHE é oxidado formando etídio, um produto fluorescente vermelho que se liga ao DNA e amplifica o sinal de fluorescência. O DCF-DA é um indicador de produção de H_2O_2 não fluorescente, e quando oxidado no interior da célula converte-se à forma fluorescente que permanece presa na célula.

DHE (160 µM) e DCF-DA (20 mM) foram adicionados à suspensão de células (10⁶ células) e incubados a 37°C por 30 minutos, no escuro, para estimar as concentrações intracelulares de $\bullet\text{O}_2^-$ e H_2O_2 . Como controle positivo, as amostras foram tratadas por 5 minutos com 10 µM de doxorrubicina ou 50 mM de H_2O_2 para criar estresse oxidativo sem causar toxicidade às células, e como

controle negativo, as células foram incubadas com etanol. As células foram, então, lavadas, ressuspendidas em PBS, e os níveis de ROS foram analisados imediatamente por citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Juan, CA). Os dados foram analisados usando o software FACSDiva (Becton Dickinson) e a sobreposição de histogramas, construída usando o software FSC Express. Para quantificação da fluorescência do DHE e DCF, as amostras foram adquiridas em duplicata e 10000 eventos foram utilizados em cada medição. As células foram excitadas a 488 nm e as fluorescências do DHE e DCF foram detectadas usando, respectivamente filtros de 585/42 e 530/30. Os dados foram expressos como média geométrica da intensidade de fluorescência.

4.9 Detecção de espécies altamente reativas de oxigênio

Espécies altamente reativas de oxigênio, como o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e ânion peroxinitrito (ONOO^-), foram seletivamente detectadas pela hidroxifenilfluoresceína (HPF) conforme técnica descrita (SETSUKINAI et al., 2003). Primeiramente, 106 células renais foram incubadas com HPF ($10\text{ }\mu\text{M}$) a 37°C por 30 minutos no escuro. Como controle positivo, as amostras foram tratadas com $100\text{ }\mu\text{M}$ de nitroprussiato de sódio e $10\text{ }\mu\text{M}$ de doxorrubicina. As células foram lavadas, ressuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Juan, CA). Os dados foram analisados usando o software FACSDiva (Becton Dickinson) e a sobreposição dos histogramas construídos usando o software FCS Express (De Novo). Para quantificação da fluorescência do HPF, amostras foram adquiridas em duplicata e 10000 eventos foram utilizados em cada medida. As células foram excitadas a 488 nm , a fluorescência foi detectada usando um filtro de $530/30$ e os dados foram expressos como média geométrica da intensidade de fluorescência.

4.10 Detecção de óxido nítrico

Para estimar a quantidade de óxido nítrico (NO) intrarrenal $2\text{ }\mu\text{M}$ do marcador fluorescente 4,5-diaminofluoresceína-2/diacetato (DAF-2/DA) foram adicionados à suspensão de células (106) e incubados a 37°C por 180 minutos no escuro. Como controle positivo, as amostras foram tratadas com $100\text{ }\mu\text{M}$ de nitroprussiato de sódio. Em seguida, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS e imediatamente analisadas no citômetro de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Juan, CA) (SCHACHNIK et al., 2009). Os dados foram analisados usando o software FACSDiva (Becton Dickinson) e a sobreposição de histogramas construída usando o software FCS Express (De Novo). Para quantificação da fluorescência do DAF as amostras foram adquiridas em duplicata e 10000 eventos foram usados em cada medida. As células foram excitadas a 488 nm , a fluorescência detectada usando filtro de $530/30$ e os dados expressos como média geométrica da intensidade de fluorescência.

4.11 Determinação dos níveis das enzimas antioxidantes por *WESTERN BLOT*

A análise da expressão proteica foi determinada pelo método de Western Blotting. As amostras foram homogeneizadas em um tampão de lise contendo (em mmol/l) 150 NaCl, 50 Tris-HCL, 5 EDTA.2Na, 1 MgCl₂ mais inibidor de protease (Sigma Fast: Sigma). A concentração proteica foi determinada pelo método de (Lowry & Rosebrough, 1951) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Quantidades iguais de proteína (50 µg), foram submetidas à eletroforese (25mA por gel para separação) em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10%. Em seguida as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose durante período de 2:40 a 60V em um sistema de blotting úmido. Após a transferência, foi realizado o bloqueio da membrana com TBS-T + leite 5% (molico desnatado) por 2:30 horas e em seguida lavada por 3 vezes com TBS-T por 5 minutos seis vezes. As membranas foram incubadas por 2 horas com anticorpos monoclonais de rato para a catalase (CAT; 1:2000; Sigma fast, EUA), os anticorpos policlonais de coelho para superóxido dismutase (SOD-2; 1:500; Sigma rápidos, USA). Após a lavagem das membranas com TBS-T, as mesmas foram incubadas com anti-mouse IgG (1:1000, Inc. Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). As mesmas membranas foram usadas para determinar a expressão β -actina utilizando um anticorpo monoclonal de mouse para β -actina (1:5000; Sigma Chemical CO, St. Louis, EUA), e os resultados foram calculados utilizando a relação entre a densidade das proteínas de interesse corrigidas pela intensidade da proteína utilizada como controle (β -actina). Para a detecção da ligação proteína-anticorpo foi realizada a incubação das membranas com ECL para geração de sinal fluorescência enzimática e depois foram analisadas em ChemiDoc Imaging Systems (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Os sinais de imunoblot foram quantificados utilizando o software Bio-Rad Image Lab

4.12 Avaliação das vias pró-oxidantes e antioxidantes

Para avaliar a contribuição das principais vias oxidantes para o desenvolvimento e manutenção dos altos níveis de EROs, foram realizados bloqueios específicos de vias envolvidas na produção de EROs e avaliação por citometria de fluxo. Da mesma forma, três principais enzimas antioxidantes foram avaliadas, com o objetivo de verificar o balanço entre a síntese e a remoção de EROs. Para determinar a contribuição de cada via, foram utilizados os seguintes bloqueios : apocinina na concentração de 600 μ M por 10 minutos para avaliar a influência da NAD(P)H oxidase; clotrimazol 100 μ M por 10 minutos para avaliar a CYP450 e alopurinol 100 μ M por 10 minutos para avaliar a participação da xantina oxidase na produção de ROS (DE SOUZA PINTO et al., 2012; MCNALLY et al., 2003). Para avaliação da capacidade antioxidante, a SOD foi inibida com a droga dietilditiocarbamato (DDC) a 500 μ M por 16 horas, a catalase foi bloqueada por 2 horas com 20 mM de 3-AT e a GPx foi inibida com o ácido mercaptossuccinico na concentração de 0,05nM por 2 horas. (DUMAY et al., 2006; FRANCO et al., 2009; UEDA et al., 2003). Decorrido este tempo, às células foram novamente marcadas, no escuro, com DHE e DCF, por 30 min à 37°C para posterior aquisição dos dados no citômetro de fluxo.

4.13 Avaliação da Apoptose

As células apoptóticas foram quantificadas pela dupla marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídio (IP) usando kit de detecção de apoptose (Becton Dickinson, San Juan, CA, USA). Para isso, células renais (5x10⁵) foram lavadas duas vezes com PBS, 2 μ l de anexina V-FITC e 2 μ l de IP foram adicionados e vortexados. As células foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente (25°) no escuro. Por fim, as células foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson). Células marcadas com Anexina V-/IP+ foram reconhecidas como necróticas, marcadas com Anexina V+/IP+ reconhecidas como apoptose tardia, e marcadas com Anexina V+/IP- reconhecidas como apoptose inicial (MONGA et al., 2013).

4.14 Análise estatística

Os valores estão expressos como média \pm EPM. A comparação estatística entre os diferentes grupos foi realizada por análise de variância (ANOVA) de 2-vias, seguida pelo post hoc de Tukey. Para a análise de correlação entre apoptose e produção de ROS foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. A significância estatística foi mensurada usando o modelo de regressão linear. A análise estatística foi feita usando o software Prisma (Prism 6, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significantes.

5.0 RESULTADOS

5.1 Etapa Botânica

O material vegetal selecionado foi constituído de folhas da *Eugenia uniflora* (EU). Realizou-se a coleta no turno da manhã (das 8 às 10h), em 30 de junho de 2016, a partir de plantas adultas localizadas no sítio Bom Sucesso dos Coqueiros. As coordenadas geográficas de localização destas plantas correspondem a: latitude de -20.8833 e longitude de -41.5333. A identificação do material vegetal foi realizada pela professora Dr^a. Juliana Aparecida Severi, da Universidade Federal do Espírito Santo. Após a realização da coleta, o material dotado de flores foi reservado para a confecção de exsicatas e estas foram depositadas no Herbário da UFES para documentação, sob o número VIES-30550.

5.2 Etapa química

Na etapa química foi realizada a prospecção fitoquímica através de testes qualitativos com o objetivo de indicar a presença dos principais compostos presentes nas folhas. Dessa forma foi identificado os seguintes compostos descritos na tabela 02.

Tabela 2: Prospecção fitoquímica qualitativa do extrato obtido das folhas de *E. uniflora* (EU).

Classe de composto	Ensaio	Resultado
Compostos Fenólicos	FeCl ₃ 5%	+
Flavonoides	AlCl ₃ 5%	+
	Shinoda	+
	Pew	+
Taninos	Gelatina 2%	+
	Pb(AcO) ₂	+
Cumarinas	KOH 10%	-
Terpenóides	Lieberman-B.	+
	Pesez	+
Glicosídeos cardiotônicos	Kedde	-
Saponinas	Agitação	+
Alcalóides	Mayer e Bouchardat	-

Avaliação da Função Renal

5.2.1 Taxa de Filtração Glomerular

A Figura 2 mostra os resultados do clearance de inulina, que representa a TFG. O tratamento com EU não alterou o clearance de inulina no grupo Sham EU ($6,8 \pm 0,3$ mL/min/Kg), quando comparado com o grupo Sham veículo (VC) ($7,5 \pm 0,5$ mL/min/Kg). Como esperado a I/R resultou em diminuição da TFG ($2,9 \pm 0,1$ mL/min/Kg, $p < 0,05$ vs. grupos sham), e a administração de EU anteriormente à indução da I/R melhorou significativamente este parâmetro ($6,6 \pm 0,8$ mL/min/Kg, $p < 0,05$ vs. IR VC).

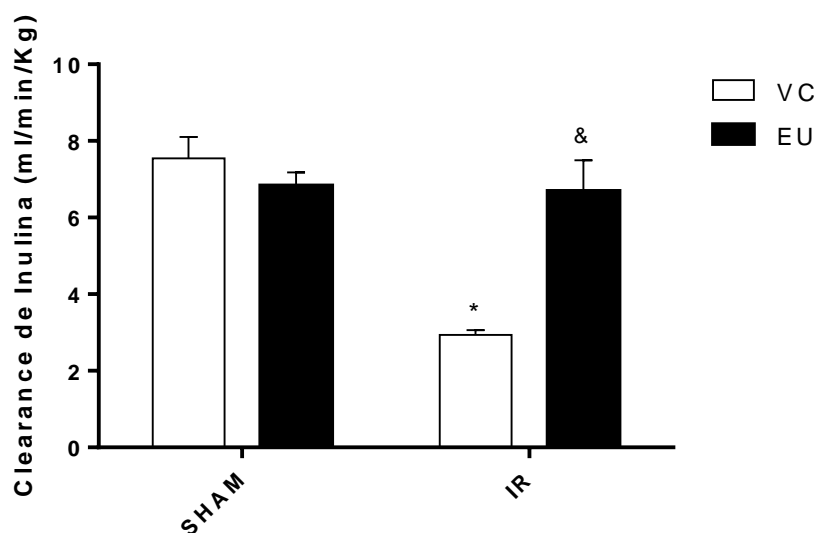


Figura 2: Taxa de filtração glomerular avaliada pelo clearance de inulina nos grupos Sham VC (n=5), Sham EU (n=5), I/R VC (n=5), I/R EU (n=7). * $p < 0,05$ vs. grupos sham; & $p < 0,05$ vs. I/R VC

5.2.2 Fluxo plasmático renal

Os resultados do *clearance* de PAH, que representa o FPR, são mostrados na Figura 3. O *clearance* de PAH não foi afetado pelo tratamento com EU no grupo Sham (VC: $24,5 \pm 0,7$ vs. EU: $21,6 \pm 2,9$ mL/min/Kg). No entanto, a indução da I/R no grupo I/R VC reduziu o FPR ($4,4 \pm 0,6$ mL/min/Kg, $p < 0,05$ vs. grupos sham), que se apresentou melhorado no grupo I/R que recebeu EU ($15,0 \pm 2,0$ mL/min/Kg, $p < 0,05$ vs. IR VC).

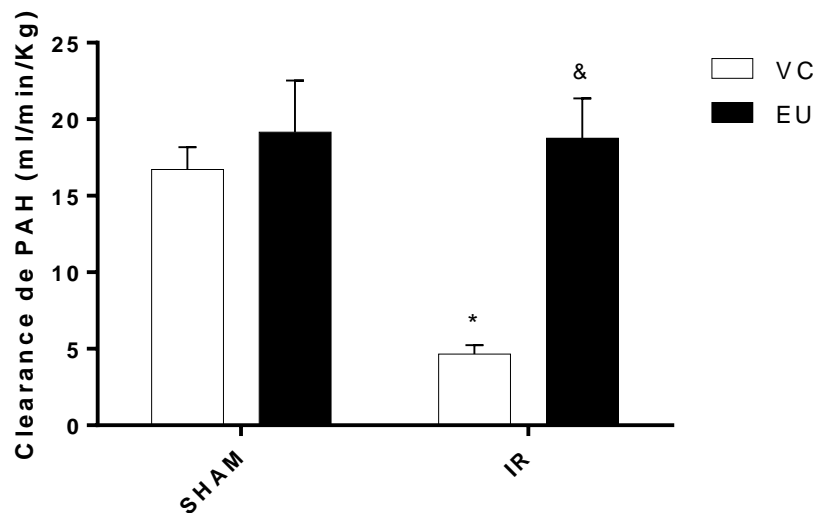


Figura 3 : Fluxo plasmático renal avaliado pelo clearance de PAH nos grupos Sham VC (n=5), Sham EU (n=5), I/R VC (n=5), I/R EU (n=7).). * $p < 0,05$ vs. grupos sham; & $p < 0,05$ vs. I/R VC;.

5.2.3 Fluxo sanguíneo renal

Para o cálculo do fluxo sanguíneo renal foram utilizados os valores de hematócrito medidos durante o protocolo de função renal, que não foi significativamente diferente entre os grupos (Sham VC: $0,39 \pm 0,017$; Sham EU: $0,39 \pm 0,023$; I/R VC $0,37 \pm 0,018$ e I/R EU: $0,39 \pm 0,008$). Portanto, o padrão de resposta do FSR foi semelhante ao do FPR, sem diferenças entre os animais Sham (VC: $26,3 \pm 3,0$ vs. EU: $29,3 \pm 7,0$ mL/min/Kg $p < 0,05$) e com uma melhora induzida pela EU no FSR do grupo I/R (VC: $7,6 \pm 0,9$ vs. EU: $29,1 \pm 4,2$ mL/min/Kg $p < 0,05$). Os resultados do FSR são mostrados na Figura 4

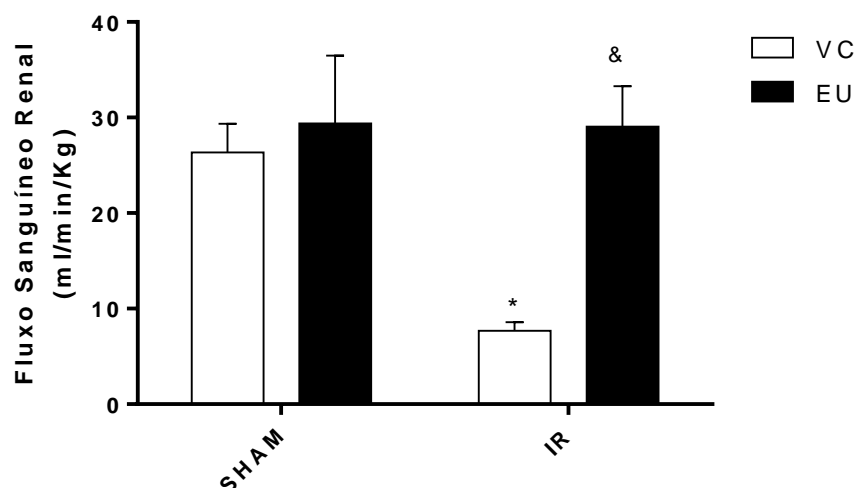


Figura 4: Fluxo sanguíneo renal nos grupos Sham VC (n=5), Sham EU (n=5), I/R VC (n=5), I/R EU (n=7). *. $p < 0,05$ vs. grupos sham; & $p < 0,05$ vs. I/R VC.

5.2.4 Resistência vascular renal

A RVR encontra-se representada na Figura 5. Observou-se um aumento da RVR no grupo I/R tratado com veículo ($21,8 \pm 5,9$ a.u.) quando comparada com os grupos Sham VC ($4,6 \pm 0,7$ a.u.) e Sham EU ($5,7 \pm 2,0$ a.u.). Novamente, o tratamento com EU apresentou um efeito positivo sobre a hemodinâmica renal, diminuindo a RVR nos animais I/R EU ($4,5 \pm 1,1$ a.u.).

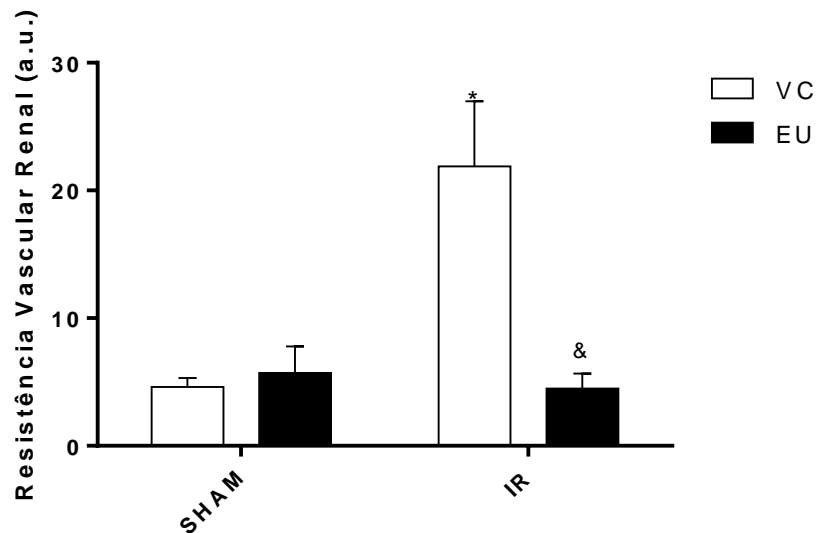


Figura 5: Fluxo plasmático renal avaliado pelo clearance de PAH nos grupos Sham VC (n=5), Sham EU (n=5), I/R VC (n=5), I/R EU (n=7). *. $p < 0,05$ vs. grupos sham; # $p < 0,05$ vs. I/R VC.

5.3 Avaliação do Estresse Oxidativo

5.3.1 Ânion Superóxido

A análise do ânion superóxido foi realizada por citometria de fluxo usando o marcador fluorescente DHE. A Figura 6 demonstra a quantificação da produção de ânion superóxido renal dos animais Sham e I/R. No córtex renal (A), nenhuma alteração na fluorescência do DHE foi observada (Sham VC: $389,7 \pm 20$; Sham EU: $378,8 \pm 22$; I/R VC: 470 ± 15 ; I/R EU: 357 ± 39 u.a.). Na medula renal (B) os animais I/R tratados com veículo apresentaram um aumento na produção do ânion superóxido ($503,12 \pm 33$ u.a.) quando comparado com os grupos Sham (VC: $344,52 \pm 23$; EU: $332,2 \pm 13$ u.a.). Porém, o aumento na fluorescência do DHE foi atenuado no grupo I/R EU ($370,69 \pm 27$ u.a.).

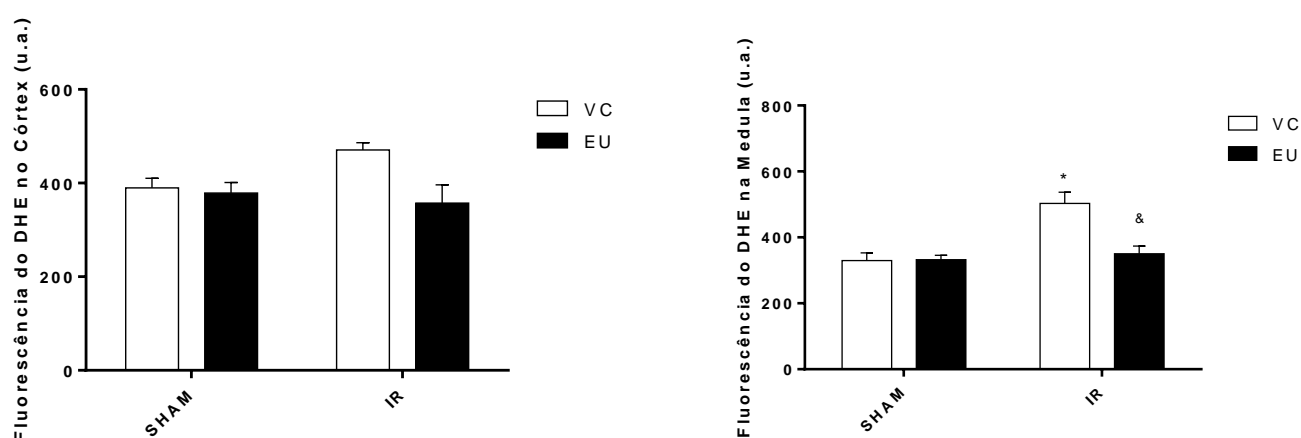


Figura 6: Produção de ânion superóxido. Quantificação da produção de ânion superóxido no Córtex (A) e Medula (B) renal nos grupos Sham VC (n=5), Sham EU (n=5), I/R VC (n=5) e I/R EU (n=6). * $p < 0,05$ vs. grupos sham; & $p < 0,05$ vs. I/R VC.

5.3.2 Peróxido de hidrogênio

A quantificação do peróxido de hidrogênio foi feita por citometria de fluxo usando o DCF (Figura 7). No córtex renal (A), a I/R (Sham VC: $509,38 \pm 34$; I/R VC: $756,7 \pm 34$ u.a.) e o tratamento com EU (Sham EU: $511,24 \pm 74$ I/R EU: $569,3 \pm 77$ u.a.) não afetaram a produção de peróxido de hidrogênio. Novamente, na medula renal (B), a I/R resultou em aumento da fluorescência do DCF (Sham VC $330,84 \pm 51$ vs. I/R VC: $571,1 \pm 62$ u.a.). A administração de EU por via oral não modificou a produção de peróxido de hidrogênio nos animais Sham (360 ± 47 u.a.), mas preveniu o aumento da fluorescência do DCF no grupo I/R ($377,5 \pm 26$ u.a.).

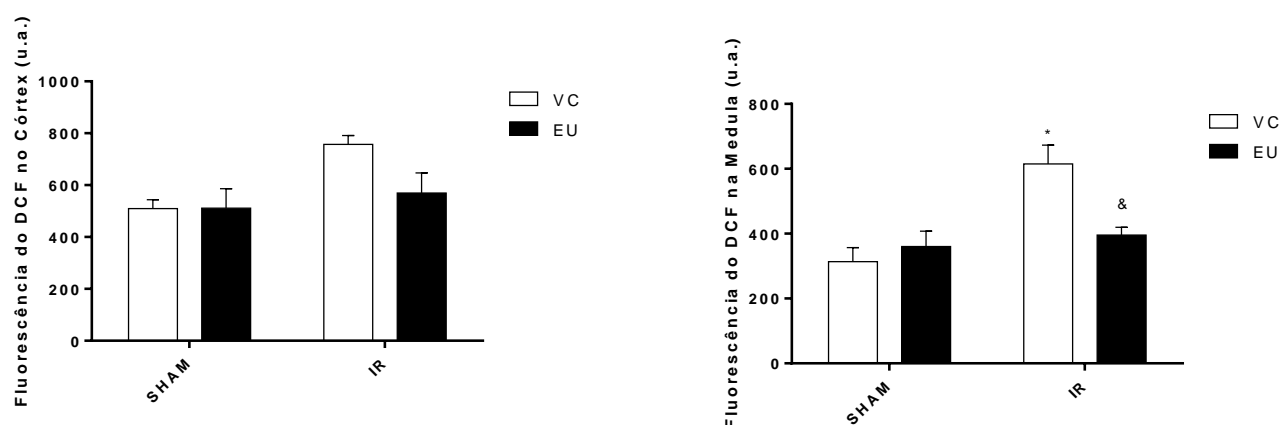


Figura 7: Produção de peróxido de hidrogênio. Quantificação da produção de peróxido de hidrogênio no Córtex (A) e Medula (B) renal. Quantificação da produção nos grupos Sham VC (n=5), Sham EU (n=5), I/R VC (n=5) e I/R EU (n=7) na medula renal.). *p<0,05 vs. grupos sham; & p<0,05 vs. I/R VC.

5.3.3 Radical hidroxila e ânion peroxinitrito

A produção de peroxinitrito e hidroxila foi calculada usando a fluorescência do HPF no córtex e medula renal (Figura 8). A quantificação do HPF demonstra que o tratamento com EU não exerce nenhum efeito sobre a produção de peroxinitrito e hidroxila no córtex renal (VC: $494,9 \pm 32$ vs. EU: $451,26 \pm 72$ u.a. vs I/R VC: $538,6 \pm 58$ vs I/R EU: $381,1 \pm 33$). Porém, a I/R aumentou a fluorescência do HPF medular ($568,2 \pm 48$ u.a. vs VC: $389,2 \pm 10$ $p < 0,05$), e o tratamento com EU nestes animais resultou na redução da produção de peroxinitrito e hidroxila no rim ($403,8 \pm 17$ u.a.).

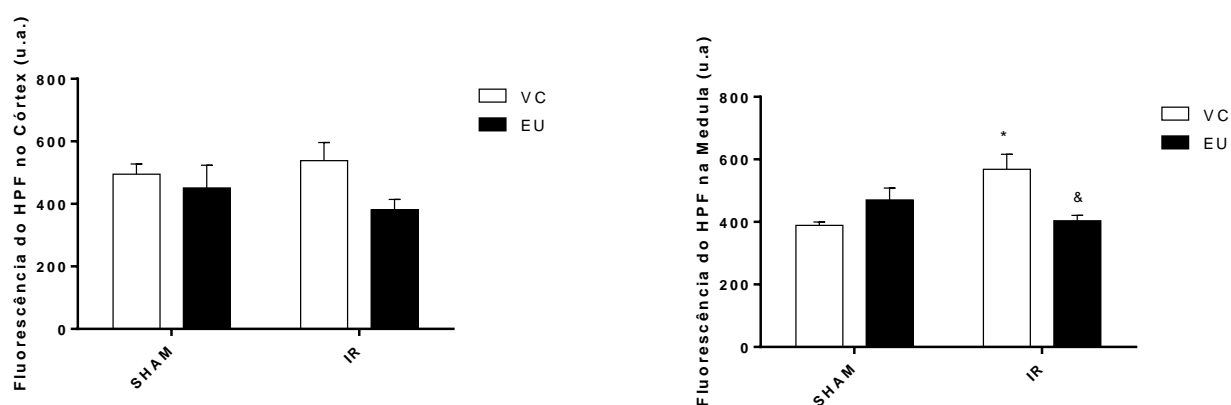


Figura 8: Produção de peroxinitrito e hidroxila. Quantificação da produção peroxinitrito e hidroxila no Córtex (A) e Medula (B) renal. Quantificação da produção nos grupos Sham VC (n=5), Sham EU (n=5), I/R VC (n=5) e I/R EU (n=7) na medula renal.).*p<0,05 vs. grupos sham; & p<0,05 vs. I/R VC.

5.3.4 Avaliação do sistema antioxidante no tecido renal

Afim de entender se o sistema de enzimas antioxidantes participa no processo de redução de EROs avaliamos três principais enzimas antioxidantes (superóxido dismutase – SOD, catalase e glutathione peroxidase). Nossos achados demonstram que o nos animais SHAMs com ou sem o tratamento com a EU possuem atividade enzimática normais para as três enzimas bloqueadas. No entanto, nos animais que sofreram a isquemia reperfusão ocorre um prejuízo da atividade do sistema enzimático, no qual o tratamento com EU foi capaz de reverter esse prejuízo encontrado nos animais com isquemia reperfusão

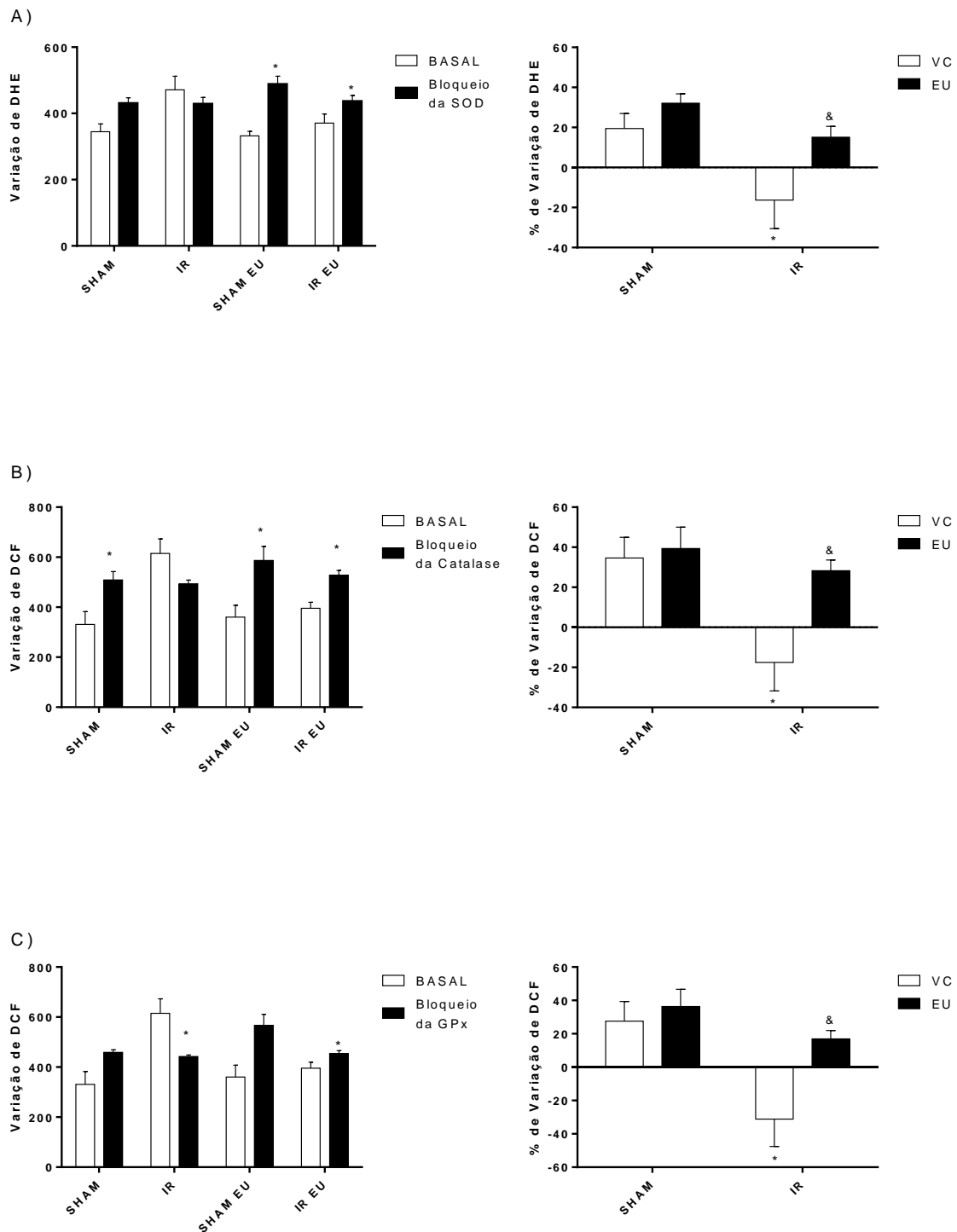


Figura 9: Avaliação da capacidade enzimática antioxidante de células renais. Do lado esquerdo, os gráficos mostram os efeitos de inibidores das enzimas (A) superóxido dismutase, (B) catalase e (C) glutathiona peroxidase na redução de EROs. No lado direito, uma análise da contribuição relativa após os bloqueios. Valores expressos como média \pm EPM, * $p < 0,05$ vs o basal e & $p < 0,05$ vs o IR

Diante dos resultados apresentados sobre a participação das atividades das enzimas antioxidantes, investigamos então, a expressão proteica dessas enzimas através da técnica de *western blot* e encontramos uma diminuição da expressão das enzimas superóxido dismutase e catalase no grupo I/R+V. Entretanto o tratamento com EU foi capaz de aumentar as expressões dessas enzimas no animais I/R (figura 09).

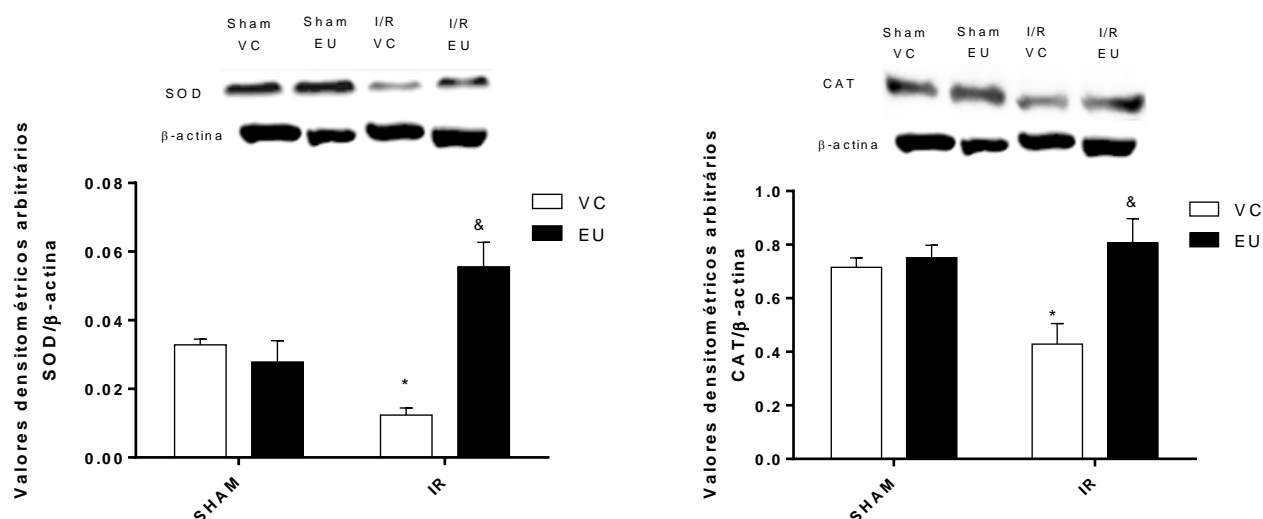


Figura 10: Análise por Western blot das enzimas SOD e Catalase em tecido renal dos animais tratados e não tratados com EU. Os dados foram expressos como média \pm EPM, Sham+VC = 7 (Catalase $0,710 \pm 0,090$ e SOD $0,030 \pm 0,003$); Sham+EU = 6 (Catalase $0,750 \pm 0,110$ e SOD $0,020 \pm 0,010$); I/R+VC=4 (catalase $0,420 \pm 0,100$ e SOD $0,010 \pm 0,005$) e I/R+EU=5 (catalase $0,080 \pm 0,200$ e SOD $0,050 \pm 0,010$). * $p < 0,05$ vs Sham e & $p < 0,05$ vs IR+V

5.3.5 Avaliação da participação das principais vias de produção de espécies reativas de oxigênio

Visto que o tratamento com EU influencia no sistema de enzimas antioxidantes, nós também avaliamos se o tratamento interfere na produção de EROs através das suas principais vias de produção que são a via mitocondrial, NADPH oxidase, e CYP450. Entretanto, o tratamento com EU não influenciou na atividade enzimática das três principais vias oxidantes.

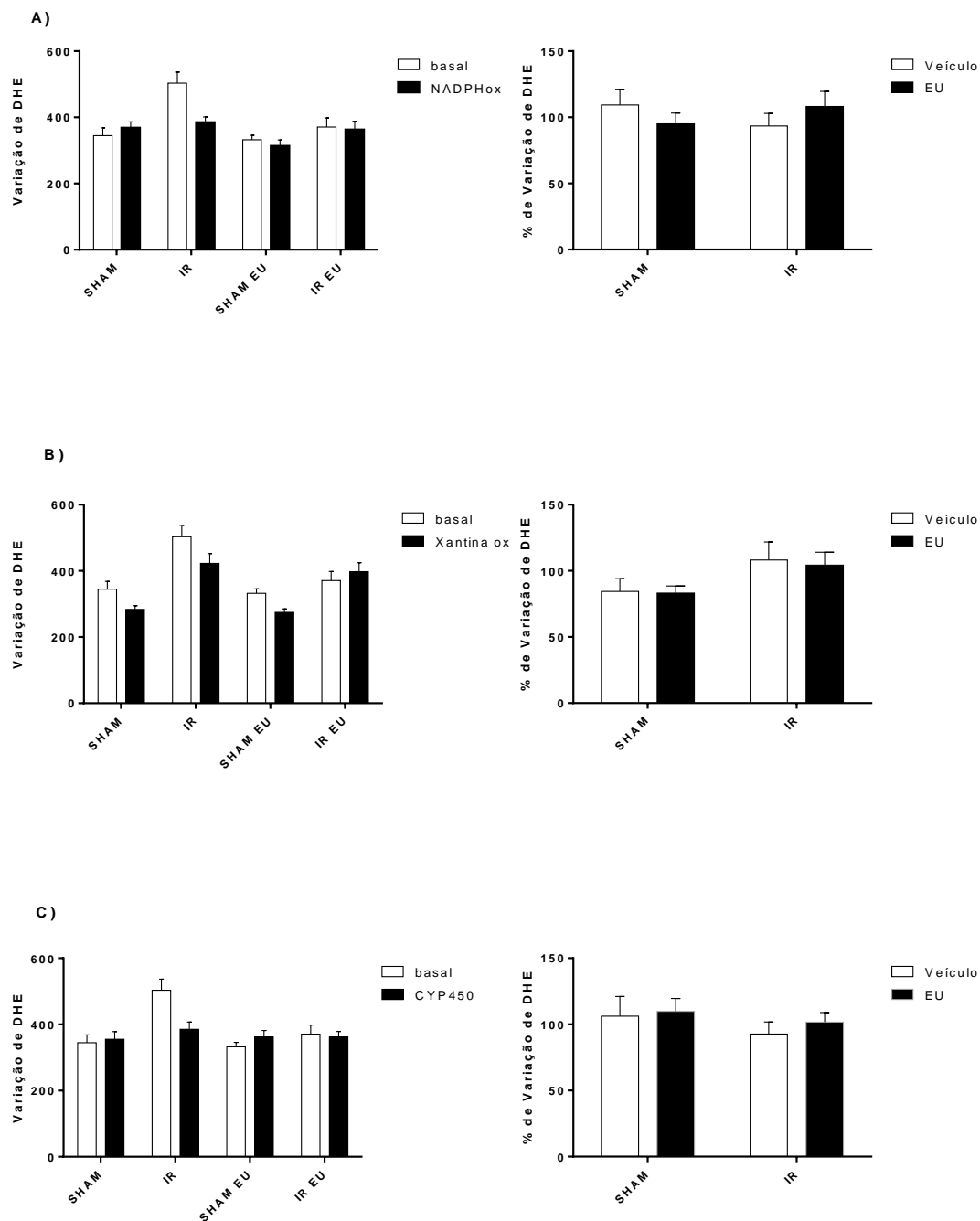


Figura 11: Avaliação das principais fontes de produção de espécies reativas de oxigênio em células de tecido renal. Do lado esquerdo, os gráficos mostram os efeitos de inibidores das enzimas (A) NADPHox, (B) Xantina oxidase e (C) citocromo P450 na produção de EROs. No lado direito, uma análise da contribuição relativa após os bloqueios. Valores expressos como média \pm EPM. Abreviações: NADPH oxidase (NADPHox) e citocromo P450 (CYP450).

5.4 Avaliação da apoptose

Os resultados de apoptose no rim podem ser visualizados na figura 12, que mostra a marcação pela Anexina V e IP. No início da apoptose, a fosfatidilserina, uma proteína normalmente localizada na superfície interna da membrana plasmática, transloca-se para superfície externa, ficando disponível para ligação com a Anexina V. O IP é um marcador específico de ácidos nucleicos que penetra nas células caso a membrana esteja permeável, não marcando as células vivas. Deste modo, a citometria de fluxo usando Anexina V e PI pode distinguir células vivas e saudáveis (Q3: Anexina V-/PI-) de células em apoptose inicial (Q4: Anexina V+/PI-) e células em apoptose tardia ou necróticas (Q2: Anexina V+/PI+). Os gráficos representativos (A) são as quantificações de apoptose (B) demonstram que a I/R aumenta significativamente a porcentagem de células apoptóticas renais ($10.20 \pm 1.2\%$) quando comparado com os animais Sham (SH+VC: 4.8 ± 1.25 ; SH+EU: $4.9 \pm 0.19\%$). O tratamento de EU promove um efeito benéfico no grupo I/R+EU ($3.9 \pm 0.9\%$), resultando em valores de apoptose bem próximos aos observados no grupo Sham.

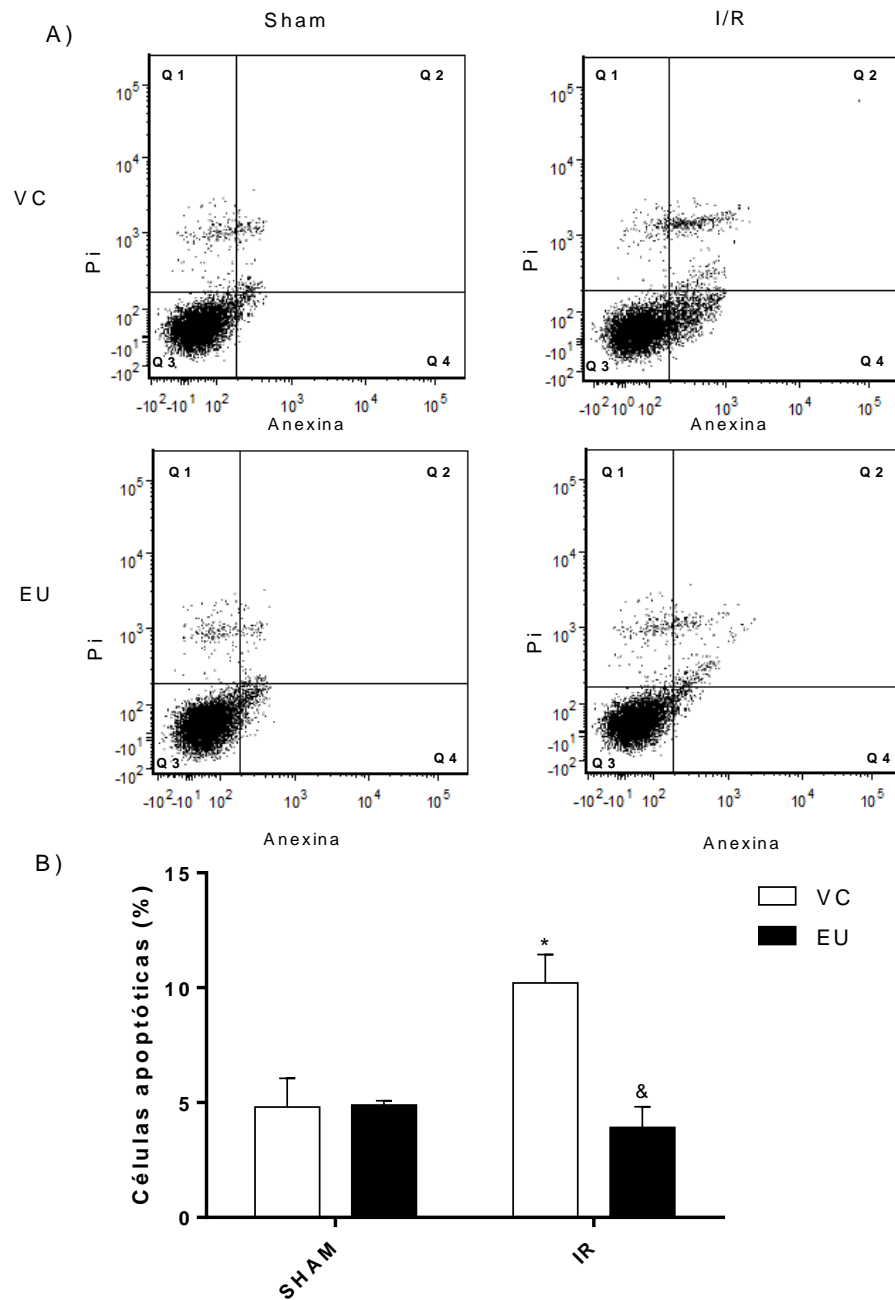


Figura 12 Detecção de apoptose por citometria de fluxo com Anexina-V e PI nos grupos Sham+VC (n=4), Sham+EU (n=4), I/R+VC (n=4), I/R+EU (n=5). (A) Dot plot representativo da citometria de fluxo de células renais marcadas com Anexina-V e PI. (B) Gráfico de barras mostrando a média de porcentagem de células apoptóticas (Q2+Q4) nos diferentes grupos. *p<0,05 vs. Sham; &p<0,05 vs. I/R+VC.

Diante dos resultados de EROs e de apoptose, apresentados pelos animais I/R tratados com EU, realizamos uma correlação entre apoptose e a produção de EROs (figura 13). A correlação demonstrou uma correlação positiva nos animais I/R+VC porém, nos animais I/R+EU essa correlação positiva desaparece evidenciando uma melhora da apoptose nos animais tratados devido uma diminuição de EROs.

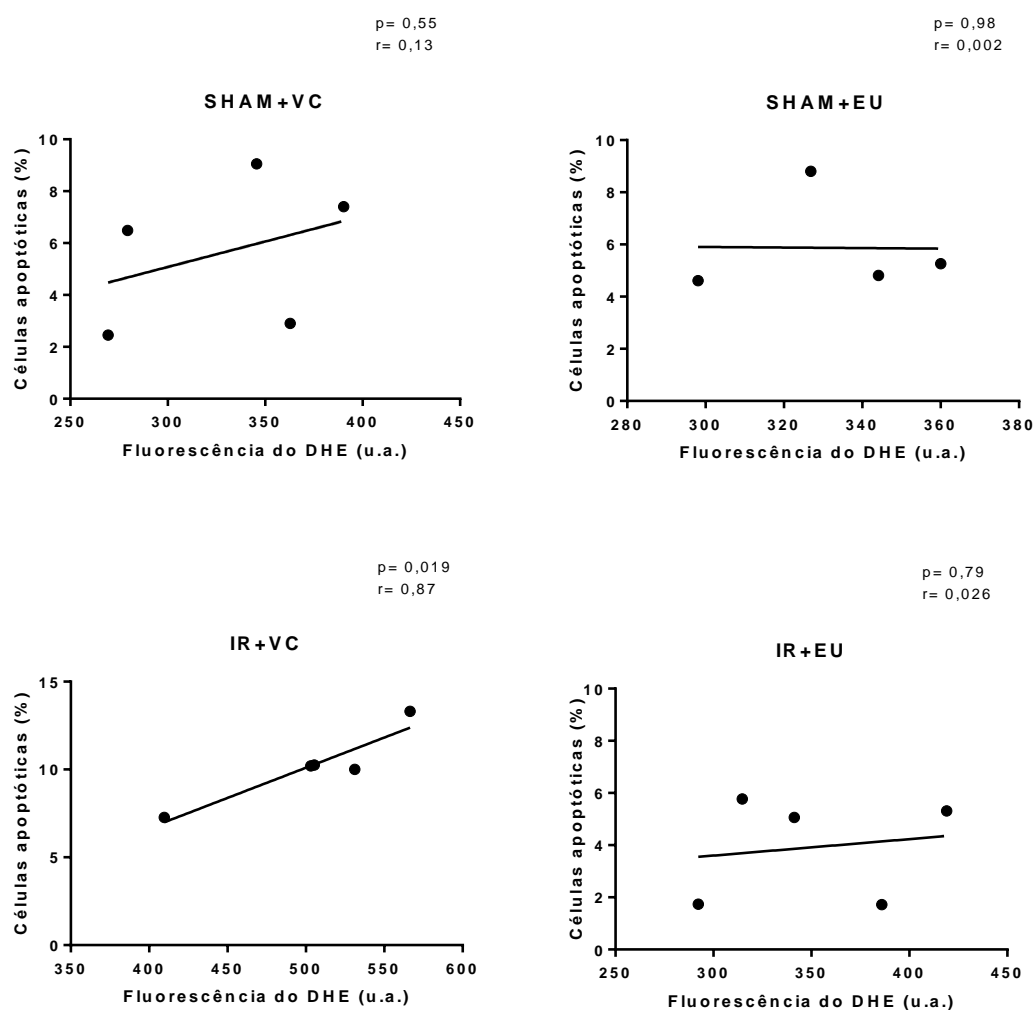


Figura 13: Análise de regressão linear e correlação entre apoptose (% de células positivas para Anexina) e produção de espécies reativas de oxigênio (fluorescência do DHE). Dados mostram uma correlação positiva entre apoptose e a produção de EROs no grupo IR+VC mas sem correlação nos grupos SHAM e IR+EU. A correlação entre variáveis foi determinada pelo coeficiente de correlação de Pearson e um modelo de regressão linear.

6.0 DISCUSSÃO

O principal objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora* sobre a função renal de ratos com lesão renal aguda induzida pelo processo de isquemia/reperfusão. Nossos resultados demonstram que a administração de 200mg/Kg do extrato durante 28 dias nos animais com LRA aumentou a taxa de filtração glomerular, o fluxo plasmático renal, o fluxo sanguíneo renal enquanto que, ao mesmo tempo, diminuiu a resistência vascular renal. O extrato de EU também diminuiu a apoptose nos animais com LRA. Ainda, na análise de estresse oxidativo foi revelado que a geração de espécies reativas de oxigênio nos animais com LRA tratados com o extrato estava reduzida em relação ao grupo sem tratamento.

Diante desses resultados, observamos que o extrato de EU pode exercer um efeito na melhora da disfunção renal. Os benefícios encontrados podem estar associados com a redução do estresse oxidativo e redução da apoptose, como observado nos nossos resultados.

Diversos estudos apresentados na literatura demonstram que grande parte dos produtos naturais que possuem uma ação de proteção renal desenvolvem essa habilidade através de um efeito antioxidante. Sendo assim, fomos investigar quais os compostos presentes no extrato de *Eugenia uniflora* e encontramos os seguintes metabólitos secundários: compostos fenólicos, flavonoides, taninos, terpenos e saponinas, e ausência dos compostos: cumarinas, glicosídeos cardiotônicos e alcaloides, todos estes evidenciados em testes fitoquímicos qualitativos.

Os compostos fenólicos são descritos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Estão amplamente distribuídos no reino vegetal, englobando desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização (ROCHA et al., 2011). Existem aproximadamente cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os ácidos fenólicos, fenóis simples, flavonoides, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis, os quais possuem atividade antioxidante comprovada (MILENE ANGELO; JORGE, 2007).

Os nossos resultados corroboram com os dados da literatura. Alguns trabalhos demonstram que o extrato de EU exhibe a presença de compostos fenólicos (FORTES et al., 2015; MARTINEZ-CORREA et al., 2011; VINHOLES; VIZZOTTO, 2017) e carotenoides (VINHOLES; VIZZOTTO, 2017). Determinados trabalhos têm demonstrado que os principais flavonoides encontrados no extrato hidroalcoólico de EU são a miricetrina (LEE et al., 1997; SAMY et al., 2014), miricetina 3-O-(4''-O-galloyl)- α -L-rhamnopiranosideo e a miricetina 3-O- β -D-glicopiranosideo (SAMY et al., 2014). Ainda também foram relatados a presença do flavonoide quercetina nos frutos (HOFFMANN-RIBANI; HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2009).

De acordo com a literatura o tratamento com flavonoide pode ser uma promissora terapia para LRA. Como demonstrado por Ohkita e colaboradores, a suplementação de flavangnol, um flavonoide, foi capaz de melhorar a função renal de ratos que foram submetidos ao processo de isquemia e reperfusão renal (OHKITA et al., 2005). Em outro estudo foi avaliado o efeito de proteção renal dos flavonoides, e encontraram que uma redução dos fatores inflamatórios presentes no processo fisiopatológico da isquemia e reperfusão (ZHAO et al., 2016).

Os carotenoides, também encontrados no extrato de EU, possuem efeito protetor renal durante a isquemia e reperfusão, pois eles reduzem a peroxidação de lipídios e diminuiu a produção de radica livres (AUGUSTI et al., 2008; PALIPOCH; THAMMARAT, 2013)

Apesar dos flavonoides serem os compostos mais ativos, com as principais atividades biológicas descritas (OKOH-ESENE et al., 2011), os taninos também possuem uma contribuição nos efeitos benéficos observados no tratamento com o extrato de EU. Taninos são compostos fenólicos, de grande interesse econômico e ecológico, possuem a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcalóides (MONTEIRO et al., 2005). Esses compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, devido à precipitação de glicoproteínas salivares, o que gera a perda do poder lubrificante (MONTEIRO et al., 2005). Além disso, os taninos também possuem um grande potencial antioxidante podendo dessa forma atuar na estabilização de radica livres.

O nosso resultado, em relação a presença de taninos, também corrobora com os da literatura. Alguns autores também encontraram taninos nos extratos de folhas de EU (AURICCHIO et al., 2007; FORTES et al., 2015; OKOH-ESENE et al., 2011; SANTOS et al., 2011). Em relação aos taninos encontrados no extrato de folhas de EU os autores descrevem os seguintes taninos: oenoteína, eugeniflorina D1 ($C_{75}H_{52}O_{48}$) e eugeniflorina D2 ($C_{68}H_{48}O_{45}$) (LEE et al., 1997).

Os achados da literatura também demonstram que extratos contendo taninos exercem um efeito protetor sob os rins. Yadav e colaboradores demonstraram que o extrato de *Ficus religiosa*, rico em taninos, possui uma ação protetora contra os danos renais causados pela cisplatina, um fármaco que possui um alto índice lesivo renal. (YADAV; SRIVASTAVA, 2013).

Outro metabolito secundário encontrado no extrato hidroalcoólico de EU foi o terpeno, esse metabolito secundário possui ampla ocorrência em plantas superiores. Além das plantas, esse composto também é encontrado em organismos marinhos, algas, microrganismos e em menor extensão em fungos. Em relação à estrutura química os mono e sesquiterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais e das resinas (GONZÁLEZ-COLOMA et al., 2011).

Os triterpenos possuem grande interesse devido a seu amplo espectro de atividade biológica, tais como anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, antidiabética, antiulcerogênica, anticariogênica, hepatoprotetora, neuroprotetora, antiparasítica, analgésica e antioxidante (GONZÁLEZ-COLOMA et al., 2011).

Além dos triterpenos, os sesquiterpenos constituem outra classe de terpenos com grande diversidade de estruturas e de ocorrência em plantas, fungos e algumas bactérias. Nas plantas, participam ativamente dos processos de interações entre planta-planta, planta-inseto e planta-patógeno protegendo-as dos ataques de predadores (FEHLBERG, 2011). Os óleos essenciais constituem uma grande fonte de sesquiterpenos e os compostos bisabolol, cariofileno, α -cadineno, β -farneseno e β -selineno apresentam ampla distribuição nos voláteis de espécies das famílias Labiatae, Myrtaceae, Pinaceae, Rutaceae e Lauraceae (FEHLBERG, 2011).

Trabalhos já relatam o uso nefroprotetor de terpenos, alguns autores já descrevem essa ação do bisabolol, um sesquiterpeno com atividade antioxidante que diminuiu o dano renal causado pela isquemia e reperfusão (LIMA et al., 2016).

A lesão por isquemia e reperfusão é a principal causa de LRA sendo o processo fisiopatológico acompanhado por diversos eventos patológicos como ruptura do citoesqueleto de actina, geração de moléculas reativas de oxigênio, resposta inflamatória e apoptose (BAGUL; FROST; DRAGE, 2013; LE CLEF et al., 2016).

O modelo experimental usado para simular a LRA foi a isquemia/reperfusão renal, que foi realizada pela ligadura das artérias renais direita e esquerda durante 45 minutos, seguida de reperfusão por um período de 24 horas. Nós observamos uma redução da taxa de filtração glomerular, o fluxo plasmático renal, o fluxo sanguíneo renal e um aumento da resistência vascular renal. Além disso, outros estudos estão em conformidade com nossos resultados, demonstrando que este modelo exhibe uma diminuição no fluxo sanguíneo renal e taxa de filtração glomerular, aumento da apoptose e espécies reativas de oxigênio, infiltração de neutrófilos no rim, e a presença de alterações histológicas características da LRA (BETZ et al., 2012b; HAGAR; ABD EL TAWAB, 2012b).

Uma vez demonstrado que o modelo é representativo em relação aos mecanismos fisiopatológicos da LRA, observamos que o tratamento com o extrato de *Eugenia uniflora* foi capaz de restabelecer taxa de filtração glomerular, a resistência vascular renal e o fluxo sanguíneo renal dos animais isquêmicos para os níveis dos animais Sham. Na literatura até o presente momento não temos trabalhos demonstrando que o uso do extrato de *Eugenia uniflora* modifica a função renal de ratos com lesão renal aguda. Entretanto, já foi relatado que o extrato de folhas de *Eugenia uniflora* é capaz de promover um efeito diurético (CONSOLINI; BALDINI; AMAT, 1999).

Além do efeito cardiovascular relatado por alguns trabalhos (CONSOLINI; BALDINI; AMAT, 1999; CONSOLINI; SARUBBIO, 2002) o extrato das folhas de *Eugenia uniflora* parece desenvolver um efeito protetor contra os fatores de risco para o desenvolvimento da diabetes, como por exemplo a manutenção dos

níveis séricos de insulina. Essa ação foi atribuída a sua propriedade antioxidante e anti-inflamatória (SCHUMACHER et al., 2015).

Sendo o gênero *Eugenia* pertencente à família Myrtaceae, alguns trabalhos demonstram que extratos de plantas pertencente a essa família possuem efeitos de proteção renal. A *Eugenia dysenterica* DC., também pertencente à família Myrtaceae, possui uma propriedade protetora renal contra lesões induzidas por metais pesados como cromo (ÁVILA et al., 2016)b.

Como já mencionado não existe dados na literatura sobre a ação de extrato de *Eugenia uniflora* modificando a função renal de animais com LRA. Entretanto, já existem descritos outras plantas capazes de alterar a função dos rins submetidos a isquemia/reperfusão. A administração do extrato etanólico de *Nigella sativa* age como um efetivo varredor de radicais livres no processo de isquemia e reperfusão, dessa forma diminuindo o prejuízo renal (BOOZARI; HOSSEINZADEH, 2017; KHAZDAIR, 2015). Outro extrato, com ação de proteção renal, é a *Zingiber officinale* sua principal ação é agir como um imunomodulador das respostas inflamatórias (BOOZARI; HOSSEINZADEH, 2017). O romã, *Punica granatum*, também possui uma ação antioxidante nos rins o que promove uma melhora da função renal de animais submetidos ao processo de isquemia e reperfusão (BOOZARI; HOSSEINZADEH, 2017; HASHEMI et al., 2013).

Os mecanismos moleculares subjacentes à lesão renal induzida por isquemia / reperfusão não são claros, mas diversos estudos têm relatado que vários fatores como: depleção de ATP, ativação de fosfolipases e infiltração de neutrófilos contribuem para a patogênese desse dano renal. O estresse oxidativo também foi considerado como um dos fatores que definitivamente estão envolvidos no desenvolvimento da LRA (OHKITA et al., 2005). Em nosso estudo, a produção de espécies reativas e altamente reativas de oxigênio foi avaliada separadamente no córtex e na medula renal através da produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, peroxinitrito e hidroxila. Estas espécies reativas de oxigênio são produzidas por vias normais do metabolismo e são retiradas do organismo por antioxidantes, no entanto, em excesso, podem exercer reações prejudiciais (BARADARAN; NASRI; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014).

O ânion superóxido ($\bullet \text{O}_2^-$) é o resultado de uma redução de oxigênio por várias oxidases, como xantina oxidase, dihidro nicotinamida adenina dinucleótido oxidase e ciclooxigenase. Além desses mecanismos de formação de ânion superóxido, as mitocôndrias, através de sua cadeia de transporte de elétrons que começam em fosforilação oxidativa com o objetivo de produção de ATP, contribuem para a produção de ânion superóxido (DRÖSE; BRANDT, 2012; GUTTERIDGE, 1994).

O ânion o superóxido é um nucleófilo ativo, capaz de atacar centros carregados positivamente e como um agente oxidante que pode reagir com doadores de hidrogênio. O radical superóxido aniônico pode dismantelar, produzindo oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, que é atribuído a enzimas pertencentes à família de superóxido dismutase, que empobrecem os radicais aniônicos que ocorrem pela ação de fatores extracelulares (incluindo radiação ionizante e deficiências oxidativas) ou do metabolismo do oxigênio na cadeia de transporte de elétrons (GUTTERIDGE, 1994). Na IRA, o $\bullet \text{O}_2^-$ também desempenha um importante papel, atuando no recrutamento de neutrófilos para área da lesão, o que amplia a extensão do dano inicial (ANDREOLI, 1991; SEHAJPAL et al., 2014). Além disso, apesar do $\bullet \text{O}_2^-$ ser um oxidante fraco, ele atua como um precursor de espécies de oxigênio mais fortes, como peróxido, peroxinitrito, hipoclorito e cloraminas (ANDREOLI, 1991; MASZTALERZ et al., 2006).

Outra espécie que participa nos processos de lesão e danos celulares é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A presença de oxidases pode resultar na síntese direta de peróxido de hidrogênio por transferência de dois elétrons para o oxigênio molecular. H_2O_2 é capaz de produzir radicais altamente reativos como resultado da sua interação com íons metálicos. A ação direta do H_2O_2 envolve o ataque à estrutura das proteínas heme com liberação de ferro, inativação enzimática e oxidação de DNA, lipídios e grupos -SH. H_2O_2 pode ser esgotado pela catalase, a enzima contendo ferro heme envolvida na conversão de peróxido de hidrogênio em água (GUTTERIDGE, 1994; PISOSCHI; POP, 2015). Assim como ocorre com o $\bullet \text{O}_2^-$ em modelos experimentais de isquemia/reperfusão renal, é demonstrado que o H_2O_2 apresenta-se aumentado

nos rins dos animais insuficientes quando comparado com o Sham (HUANG et al., 2012).

Outro radical que é altamente perigoso devido a sua reatividade ser a mais elevada são os radicais hidroxila (OH). Ao contrário dos radicais superóxido que são considerados relativamente estáveis e têm taxas de reação relativamente baixas e constantes com componentes biológicos, os radicais hidroxílicos são espécies de curta duração que possuem alta afinidade para outras moléculas. (OH), como já mencionado, é um poderoso agente oxidante que pode reagir com a maioria das moléculas orgânicas e inorgânicas da célula, incluindo DNA, proteínas, lipídios, aminoácidos, açúcares e metais. As 3 principais reações químicas de radicais hidroxílicos incluem a absorção, adição e transferência de elétrons de hidrogênio (KOHEN; NYSKA, 2002).

O ânion peroxinitrito é um potente oxidante produzido pela reação entre o $\bullet\text{O}_2^-$ e o NO ($\text{NO} + \bullet\text{O}_2^- = \text{ONOO}^-$). Quando o ONOO^- está na forma protonada (ONOOH), possui reatividade semelhante ao $\text{HO}\bullet$ (LI; JACKSON, 2002; NOIRI et al., 2001). Tanto o $\text{HO}\bullet$, quanto o ONOO^- podem ser classificados como espécies altamente reativas de oxigênio por possuir poder oxidante forte o suficiente para hidroxilar diretamente anéis aromáticos (SETSUKINAI et al., 2003).

Portanto, na isquemia/reperfusão renal, todas estas moléculas oxidantes reagem, em maior ou menor grau, com proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e lipídios das membranas celulares, resultando em formação de radicais orgânicos, inativação de enzimas, peroxidação lipídica, oxidação proteica e destruição de células renais (MASZTALERZ et al., 2006).

No nosso estudo observamos um aumento da produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e ânion peroxinitrito na medula renal dos animais isquêmicos, que foram revertidos pelo tratamento com extrato de EU. Interessantemente, não foram constatadas diferenças na produção de ROS no córtex renal entre os diferentes grupos. O fato da produção de radicais livres ser maior na medula do que no córtex renal pode ser explicada pois o processo fisiopatológico da LRA provocada por isquemia/reperfusão renal desencadeia, principalmente, mudanças estruturais e funcionais em células tubulares e

endoteliais, com dano proeminente nos néfrons justamedulares e remodelamento túbulo-intersticial mais evidente na medula do que no córtex (BAGUL; FROST; DRAGE, 2013). Além disso, estruturas localizadas na medula renal, como o ramo medular ascendente espesso da alça de Henle, são particularmente sensíveis à diminuição do oxigênio, sendo bastante afetadas durante a isquemia (BEŁTOWSKI, 2010).

Tendo em vista que o desenvolvimento do estresse oxidativo contribui para a indução da lesão renal na isquemia/reperfusão, o tratamento da LRA com diversas substâncias antioxidantes tem se mostrado promissor. Como exemplos podemos citar o tempol (CHATTERJEE et al., 2000), a vitamina C (MILORADOVIC et al., 2009), agonistas do receptor de proliferação de peroxissomo ativado (BETZ et al., 2012b; ZOU et al., 2013), inibidores da fosfodiesterase-4 (MAMMADOV et al., 2012) e inibidores da fosfodiesterase-5 (DE ALMEIDA et al., 2016; ZAHRAN et al., 2015a). Moléculas que atuam inibindo a infiltração de neutrófilos também se mostraram capazes de reduzir o estresse oxidativo na LRA (HAGAR; ABD EL TAWAB, 2012a).

Em relação ao extrato hidroalcoólico de EU, nosso estudo mostrou o seu efeito antioxidante a nível de função renal através da avaliação das EROs. Sendo assim, buscamos avaliar as vias de produção de EROs e da capacidade antioxidante. Diante dos nossos achados observamos que o extrato de EU foi capaz de aumentar a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase, e a glutathione peroxidase, enzimas que reduzem as taxas de oxidação no organismo e, por conseguinte, interrompem a progressão da lesão na LRA.

Os dados da literatura demonstram que o uso de produtos naturais, tais como extratos de plantas, possuem um potencial terapêutico sob a LRA devido a presença de flavonoides, polifenóis e saponinas os quais estão envolvidos na redução do estresse oxidativo por mecanismos semelhantes, como por exemplo o aumento da atividade da SOD, catalase, glutathione peroxidase (PALIPOCH; THAMMARAT, 2013) e diminuição dos fatores inflamatórios (YANG et al., 2016).

Outro extrato de planta, com atividade antioxidante, demonstra resultados similares aos do nosso estudo em relação ao aumento da atividade da SOD e catalase. Segundo Senturk e colaboradores, o extrato de *Hypericum*

origanifolium foi capaz de realizar uma proteção renal nos animais com isquemia e reperfusão sendo atribuído essa ação ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes e com redução do estresse oxidativo (SENTURK et al., 2013). Em outro estudo observaram que produtos naturais, oriundos da medicina tradicional chinesa, possuem o efeito de diminuir os danos causados pela isquemia e reperfusão devido ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes (DONG et al., 2016).

Também é conhecido que a isquemia/reperfusão renal leva ao aumento da atividade de enzimas oxidantes, como NADPH oxidase e xantina oxidase, que geram espécies reativas de oxigênio e induzem metaloproteínases da matriz (TSUDA et al., 2012; WU et al., 2009), corroborando com os achados da literatura os nossos resultados apresentaram um aumento da atividade das enzimas oxidantes nos animais com isquemia reperfusão. Entretanto, o tratamento com o extrato não reduziu a atividade dessas enzimas. Sendo assim, sugerimos que o principal mecanismo de ação do extrato de *Eugenia uniflora* é via aumento da atividade da via antioxidante.

Diante disso, verificamos se o extrato foi capaz de alterar as expressões proteicas das enzimas antioxidantes. Nossos resultados mostram que houve um aumento da expressão proteica da superóxido dismutase e da catalase, corroborando assim com os resultados encontrados na literatura. Erboğa e colaboradores demonstraram que o uso de quercetina, um flavonoide presente em vários extratos de plantas, foi capaz de aumentar a expressão proteica da SOD e catalase e dessa forma impedindo a progressão da lesão renal (ERBOĞA et al., 2015).

Estudos tem evidenciado a existência de um sistema de regulação de transcrição de genes antioxidantes chamado de Nrf2/Keap1 (Fator nuclear fator eritróide 2 relacionado com proteína Kelch-like ECH associada 1). Esse sistema funciona da seguinte forma: em condições normais a proteína Keap 1, presente no citosol, sequestra a Nrf2 e encaminha a mesma para ubiquitinação, processo de marcação com a proteína ubiquitina. Uma vez marcada com a ubiquitina o complexo formado Nrf2/ubiquitina é degradado por um complexo multiproteico denominado proteassoma. Em condições de estresse oxidativo os resíduos de cisteínas presentes na Keap1 são modificados promovendo mudanças

conformacionais levando à liberação de Nrf2 e à ativação transcricional de uma série de genes portadores de elementos de respostas antioxidantes, que codificam enzimas desintoxicantes, enzimas de remoção de ROS (CHOI; KANG; KWAK, 2014; SHELTON; KEVIN PARK; COPPLE, 2013).

Dados da literatura demonstram que os flavonoides possuem propriedades de interferir nessa via de transcrição. Qiu e colaboradores demonstraram que os flavonoides possuem propriedades de ativação da via Nrf2 promovendo uma melhora do estresse oxidativo (QIU et al., 2017). Segundo Wakabayashi e colaboradores substâncias como os triterpenoides possuem a propriedade de modificar os resíduos de cisteínas da Keap1 levando a ativação da via Nrf2 promovendo um aumento codificação de enzimas antioxidantes como SOD, catalase e glutathione peroxidase (WAKABAYASHI et al., 2004)

Sabendo que a lesão renal por isquemia e reperfusão é resultante de eventual morte de células renais devido a uma combinação de apoptose e necrose, avaliamos por citometria de fluxo o rim dos ratos I/R, os quais apresentaram células apoptóticas, corroborando com outros estudos no mesmo modelo experimental de LRA, tanto em ratos (SI et al., 2014), quanto em camundongos (KUMAR et al., 2009). Nosso estudo é o primeiro a avaliar os efeitos do extrato de *Eugenia uniflora* na apoptose in vivo quando administrada através da via oral, e observamos que o tratamento com o extrato foi capaz de reduzir a apoptose nos ratos isquêmicos até os níveis do Sham.

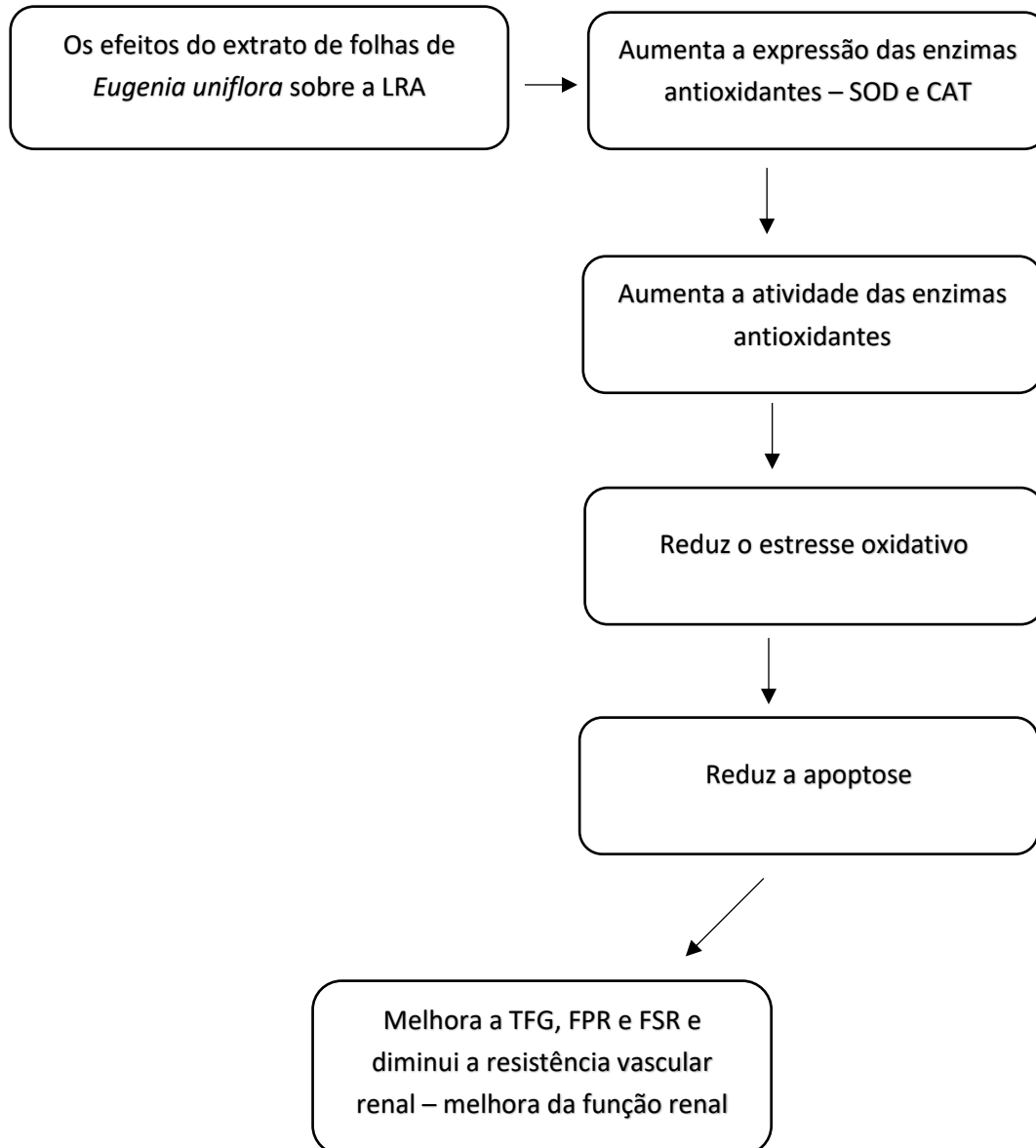
Outros extratos hidroalcoólico de plantas como *Eugenia dysenterica*, possuem efeito de redução de apoptose renal como demonstrado por Ávila e colaboradores em que o tratamento promoveu uma proteção renal por diminuição da apoptose e do estresse oxidativo (ÁVILA et al., 2016). Entretanto, em um outro estudo Denardin e colaboradores demonstram que o extrato da pitanga roxa induziu a apoptose através da ativação do mecanismo de autofagia celular, porém de acordo com o próprio autor esse mecanismo ativado pelo extrato de pitanga roxa precisa ser melhor esclarecido (DENARDIN et al., 2017).

A melhora da apoptose no grupo I/R tratado com extrato de *Eugenia uniflora* pode estar associada com a diminuição de espécies de oxigênio neste grupo, uma vez que está bem estabelecido que a produção de espécies reativas de

oxigênio são capazes de iniciar morte celular nas formas de necrose ou apoptose (LI; JACKSON, 2002). Sendo assim, os nossos resultados de correlação corroboram com a literatura pois, demonstramos que existe uma correlação positiva entre a produção de espécies reativas de oxigênio e apoptose e a mesma desaparece quando ocorre uma diminuição das EROs. Dessa forma, o aumento de EROs está diretamente associada ao aumento da apoptose nos rins colaborando para a progressão da lesão renal.

7.0 SUMARIZANDO OS RESULTADOS

Sumarizando os efeitos do extrato de folhas de *Eugenia uniflora*



8.0 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram, que o extrato das folhas de *Eugenia uniflora* possui efeitos benéficos funcionalmente na lesão renal aguda induzida pela técnica de isquemia/reperfusão renal. Esta melhora da função renal parece estar ligada à redução do estresse oxidativo e da apoptose. Estes achados sugerem que o extrato da *Eugenia uniflora* possui potencial para utilização como terapia coadjuvante para prevenção/tratamento da lesão renal aguda.

9.0 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, N. et al. Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. **Revista Multiciência**2, v. 61, n. 1, p. 1359–1369, 2009.
- ALICE, C. B. et al. Screening of plants used in south Brazilian folk medicine. **Journal of ethnopharmacology**, v. 35, n. 2, p. 165–71, dez. 1991.
- AMAT, A. G.; VAJIA, M. E. Plantas medicinales y etnofarmacología en la provincia de Misiones (Argentina). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, 1991.
- ANDREOLI, S. P. Reactive oxygen molecules, oxidant injury and renal disease. **Pediatric nephrology (Berlin, Germany)**, v. 5, n. 6, p. 733–742, nov. 1991.
- ARAI, I. et al. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 68, n. 1–3, p. 307–314, dez. 1999.
- AUGUSTI, P. R. et al. Effect of astaxanthin on kidney function impairment and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46, n. 1, p. 212–219, jan. 2008.
- AURICCHIO, M. T. et al. Atividades antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 76–81, 2007.
- ÁVILA, R. I. DE et al. *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae) exerts chemopreventive effects against hexavalent chromium-induced damage *in vitro* and *in vivo*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 11, p. 2652–2663, 30 nov. 2016.
- BAGETTI, M. et al. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 147–154, 2011.
- BAGUL, A.; FROST, J. H.; DRAGE, M. In-Depth Topic Review Stem Cells and Their Role in Renal Ischaemia Reperfusion Injury. **Am J Nephrol**, v. 37, p. 16–29, 2013.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. **Drug discovery from medicinal plants**.

Life Sciences. **Anais...2005**Disponível em: <http://webpace.pugetsound.edu/facultypages/bdasher/Chem361/Review_Articles_files/Drugs from Plants.pdf>. Acesso em: 19 set. 2017

BANDONI, A. L. et al. Survey of Argentine medicinal plants. I. Folklore and phytochemical screening. **Lloydia**, v. 35, n. 1, p. 69–80, mar. 1972.

BARADARAN, A.; NASRI, H.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. **Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 19, n. 4, p. 358–367, 4 abr. 2014.

BARROS, E. **Medicina Interna na Prática Clínica**. Porto Alegre - RS: Artmed: [s.n.].

BASTING, R. T. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. in rodents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 157, p. 257–267, nov. 2014.

BELLOMO, R.; KELLUM, J. A.; RONCO, C. Acute kidney injury. **The Lancet**, v. 380, n. 9843, p. 756–766, ago. 2012.

BEŁTOWSKI, J. Hypoxia in the Renal Medulla: Implications for Hydrogen Sulfide Signaling. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 334, n. 2, p. 358 LP-363, 16 jul. 2010.

BETZ, B. et al. Rosiglitazone affects nitric oxide synthases and improves renal outcome in a rat model of severe ischemia/reperfusion injury. **PPAR Res**, v. 2012, p. 219319, 2012a.

BETZ, B. et al. Rosiglitazone Affects Nitric Oxide Synthases and Improves Renal Outcome in a Rat Model of Severe Ischemia/Reperfusion Injury. **PPAR Research**, v. 2012, p. 1–12, 2012b.

BOOZARI, M.; HOSSEINZADEH, H. Natural medicines for acute renal failure: A review. **Phytotherapy Research**, 13 out. 2017.

BRASIL, P. B. **SUS tem fitoterápicos para doenças simples — Portal Brasil**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2012/11/sus-tem-fitoterapicos-para-doencas-simples>>. Acesso em: 19 set. 2017.

BRASIL DATASUS. **Mortalidade por insuficiência renal aguda**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>>. Acesso em: 18 set. 2017.

CAMPAGNARO, B. P. et al. DNA damage and augmented oxidative stress in bone marrow mononuclear cells from angiotensin-dependent hypertensive mice. **International Journal of Hypertension**, p. ID 305302, jan. 2013.

CHATTERJEE, P. K. et al. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. **Kidney international**, v. 58, n. 2, p. 658–673, ago. 2000.

CHOI, B. H.; KANG, K. S.; KWAK, M. K. Effect of redox modulating NRF2 activators on chronic kidney disease. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12727–12759, 2014.

CONSOLINI, A.; BALDINI, O.; AMAT, A. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 33–39, 1999.

CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **Journal of ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 57–63, jun. 2002.

DE ALMEIDA, L. S. et al. Sildenafil prevents renal dysfunction in contrast media-induced nephropathy in Wistar rats. **Human & experimental toxicology**, jan. 2016.

DE SOUZA PINTO, R. et al. Inhibition of Macrophage Oxidative Stress Prevents the Reduction of ABCA-1 Transporter Induced by Advanced Glycated Albumin. **Lipids**, v. 47, n. 5, p. 443–450, 21 maio 2012.

DENARDIN, C. C. et al. Autophagy induced by purple pitanga (*Eugenia uniflora* L.) extract triggered a cooperative effect on inducing the hepatic stellate cell death. **Cell Biology and Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 197–206, 2017.

DIAS, A. T. et al. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. **Journal of translational medicine**, v. 12, p. 35, 6 fev. 2014.

DONG, Q. et al. The protective effect of herbal polysaccharides on ischemia-reperfusion injury. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 431–440, 1 nov. 2016.

DRÖSE, S.; BRANDT, U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 748, p. 145–169, 2012.

DUMAY, A. et al. The superoxide dismutase inhibitor diethyldithiocarbamate has antagonistic effects on apoptosis by triggering both cytochrome c release and caspase inhibition. **Free radical biology & medicine**, v. 40, n. 8, p. 1377–1390, abr. 2006.

EL-SHENAWY, S. M. A. Evaluation of some pharmacological activities of ethanol extracts of seeds, pericarp and leaves of *Eugenia Jamolana* in rats. **Inflammopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 85–92, abr. 2009.

ERBOGA, M. et al. Renal Failure Quercetin ameliorates methotrexate-induced renal damage, apoptosis and oxidative stress in rats. **Ren Fail**, v. 37, n. 9, p. 1525–6049, 2015.

FEHLBERG, I. **Terpenos e Fenilpropanoides de Myrcia guianensis (MYRTACEAE)**. [s.l.] Universidade Federal da Bahia, 2011.

FERRO, E. et al. EUGENIA UNIBZORA LEAF EXTRACT AND LIPID METABOLISM IN CEI?US APELLA MONKEYS. **Journal of Ethnopharmncology**, v. 24, p. 321–325, 1988.

FOLKMANN, J. K.; LOFT, S.; MØLLER, P. Oxidatively damaged DNA in aging dyslipidemic ApoE À/À and wild-type mice. **Mutagenesis**, v. 22, n. 2, p. 105–110, 2007.

FORTES, G. A. C. et al. Antioxidant Activities of Hydrolysable Tannins and Flavonoid Glycosides Isolated from *Eugenia uniflora* L. **Records of Natural Products**, v. 9, n. 2, p. 251–256, abr. 2015.

FRANCO, J. L. et al. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. **Free radical biology & medicine**, v. 47, n. 4, p. 449–457, ago. 2009.

FUHR, J.; KACZMARCZYK, J.; KRUTTGEN, C. D. [A simple colorimetric method of inulin determination in renal clearance studies on metabolically normal subjects and diabetics]. **Klinische Wochenschrift**, v. 33, n. 29–30, p. 729–730, ago. 1955.

FURUICHI, K. et al. Effects of adipose-derived mesenchymal cells on ischemia–reperfusion injury in kidney. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 16, n. 5, p. 679–689, 2012.

GARCIA MDEL, C.; GODOY, Y. C.; CELUCH, S. M. Impaired hypotensive responses induced by intrathecally injected drugs in fructose-fed rats. **Eur J Pharmacol**, v. 706, n. 1–3, p. 17–24, 2013.

GHOSH, A. et al. Antiapoptotic efficacy of seed of *Eugenia jambolana* on testicular germ cell in experimental diabetic rat: A genomic study. **Andrologia**, v. 48, n. 3, p. 282–292, abr. 2016.

GONZÁLEZ-COLOMA, A. et al. Triterpene-based plant defenses. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 2, p. 245–260, 2011.

GUTTERIDGE, J. M. C. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. **Chemico-Biological Interactions**, v. 91, p. 133–140, 1994.

HAGAR, H. H.; ABD EL TAWAB, R. Cysteinyl leukotriene receptor antagonism alleviates renal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. **J Surg Res**, v. 178, n. 1, p. e25–34, 2012a.

HAGAR, H. H.; ABD EL TAWAB, R. Cysteinyl leukotriene receptor antagonism alleviates renal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. **J Surg Res**, v. 178, n. 1, p. e25–34, nov. 2012b.

HASHEMI, K. et al. Turkish Journal of Biology Pomegranate (*Punica granatum* L.) reduces endoplasmic reticulum stress induced by renal ischemia/reperfusion injury in rat. **Turk J Biol**, v. 37, p. 464–471, 2013.

HOFFMANN-RIBANI, R.; HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 4, p. 263–268, 2009.

HUANG, L. et al. Overexpression of stanniocalcin-1 inhibits reactive oxygen species and renal ischemia/reperfusion injury in mice. **Kidney international**, v. 82, n. 8, p. 867–877, 13 out. 2012.

IWAI, M.; HORIUCHI, M. Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. **Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 32, n. 7, p. 533–6, jul. 2009.

JOSINO SOARES, D. et al. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) fruit juice and two major constituents thereof exhibit anti-inflammatory properties in human gingival and oral gum epithelial cells. **Food Funct.**, v. 5, n. 11, p. 2981–2988, 17 set. 2014.

KDIGO Clinical Practices Guideline for Acute Kidney Injury. **Official Journal of the International Society of Nephrology - Kidney International Supplements**, v. 2, n. 1, p. 124–138, 2012.

KELLUM, J. A et al. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. **Kidney international supplements**, v. 2, n. 1, p. 1–138, 2012.

KELLUM, J. A.; LAMEIRE, N. Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 1). **Critical Care**, v. 17, n. 1, p. 204, 4 fev. 2013.

KHAZDAIR, M. R. **The Protective Effects of Nigella sativa and Its Constituents on Induced Neurotoxicity** *Journal of Toxicology* Hindawi, , 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26604923>>. Acesso em: 17 out. 2017

KIM, S.-M. et al. Angiotensin II-Induced Mitochondrial Nox4 Is a Major Endogenous Source of Oxidative Stress in Kidney Tubular Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e39739, 9 jul. 2012.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 6, p. 620–650, out. 2002.

KORKMAZ, A.; KOLANKAYA, D. Inhibiting inducible nitric oxide synthase with rutin reduces renal ischemia/reperfusion injury. **Canadian Journal of Surgery**,

v. 56, n. 1, p. 6–14, fev. 2013.

KUMAR, S. et al. Dexamethasone Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 20, n. 11, p. 2412–2425, 19 nov. 2009.

LE CLEF, N. et al. Unilateral renal ischemia-reperfusion as a robust model for acute to chronic kidney injury in mice. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, 2016.

LEE, M. H. et al. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1343–1349, 1 abr. 1997.

LI, C.; JACKSON, R. M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 282, n. 2, p. C227-41, fev. 2002.

LI, P. K. T.; BURDMANN, E. A.; MEHTA, R. L. Acute kidney injury: global health alert. **Kidney International**, v. 83, n. 3, p. 372–376, 1 mar. 2013.

LIMA, T. et al. ischemic-reperfusion acute kidney injury. v. 23, p. 1843–1852, 2016.

LOMBARDI, R. et al. Epidemiology of Acute Kidney Injury in Latin America. **Seminars in Nephrology**, v. 28, n. 4, p. 320–329, 1 jul. 2008.

MAKRIS, K.; SPANOU, L. Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes. **The Clinical biochemist. Reviews**, v. 37, n. 2, p. 85–98, 2016.

MALEK, M.; NEMATBAKHSH, M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. **Journal of renal injury prevention**, v. 4, n. 2, p. 20–7, 2015.

MAMMADOV, E. et al. Protective effects of phosphodiesterase-4-specific inhibitor rolipram on acute ischemia-reperfusion injury in rat kidney. **Urology**, v. 80, n. 6, p. 1390.e1-6, dez. 2012.

MARTINEZ-CORREA, H. A. et al. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 3, p. 998–1006,

1 jan. 2011.

MASZTALERZ, M. et al. Superoxide anion as a marker of ischemia-reperfusion injury of the transplanted kidney. **Transplantation proceedings**, v. 38, n. 1, p. 46–48, 2006.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. [s.l.] Edições UFC, 2009.

MCNALLY, J. S. et al. Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 285, n. 6, p. H2290–H2297, dez. 2003.

MILENE ANGELO, P.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

MILORADOVIC, Z. et al. Comparative effects of L-arginine and vitamin C pretreatment in SHR with induced postischemic acute renal failure. **General physiology and biophysics**, v. 28 Spec No, p. 105–111, 2009.

MONGA, J. et al. Growth inhibition and apoptosis induction by (+)-cyanidan-3-ol in hepatocellular carcinoma. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e68710, 2013.

MONTEIRO, J. M. et al. **Taninos: Uma abordagem da química à ecologia**. Química Nova, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v28n5/25920.pdf>>. Acesso em: 18 out. 2017

NASH, K.; HAFEEZ, A.; HOU, S. Hospital-acquired renal insufficiency. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 39, n. 5, p. 930–936, 1 maio 2002.

NOIRI, E. et al. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 281, n. 5, p. F948 LP-F957, 1 nov. 2001.

OHKITA, M. et al. Preventive effect of flavangenol on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. **BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN**, v. 28, n. 9, p. 1655–1657, 2005.

OKOH-ESENE et al. Proximate and phytochemical analysis of leaf , stem and

root of *Eugenia uniflora* (Surinam or Pitanga cherry). **Journal of Natural Product and Plant Resource**, v. 1, n. 4, p. 1–4, 2011.

PALIPOCH, S.; THAMMARAT, N. S. Palipoch Afr J Tradit Complement Altern Med . (2013) 10 (4): 88-93. v. 10, p. 88–93, 2013.

PATEL, N. S. A. et al. Endogenous Interleukin-6 Enhances the Renal Injury, Dysfunction, and Inflammation Caused by Ischemia/Reperfusion. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 312, n. 3, p. 1170–1178, 1 dez. 2004.

PIO CORRÊA, M.; PENA, L. DE A. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas (e-book, 1984) [WorldCat.org]**. 1. ed. Rio de Janeiro : [s.n.].

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

PRICE, P. M.; SAFIRSTEIN, R. L.; MEGYESI, J. The cell cycle and acute kidney injury. **Kidney international**, v. 76, n. 6, p. 604–613, set. 2009.

QIU, Y. et al. Total Flavonoid Extract from *Abelmoschus manihot* (L.) Medic Flowers Attenuates -Galactose-Induced Oxidative Stress in Mouse Liver Through the Nrf2 Pathway. **Journal of Medicinal Food**, v. 20, n. 6, p. 557–567, 2017.

RATERA, E.E., RATERA, M. O. **Plantas de la Flora Argentina empleadas en Medicina Popular**. [s.l: s.n.].

REWA, O.; BAGSHAW, S. M. Acute kidney injury—epidemiology, outcomes and economics. **Nature Reviews Nephrology**, v. 10, n. 4, p. 193–207, 21 jan. 2014.

RICCI, Z.; RONCO, C. New insights in acute kidney failure in the critically ill. **Swiss Med Wkly**, v. 142, p. w13662, jan. 2012.

ROCHA, W. S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215–1221, 2011.

SABBAHY, M. EL; VAIDYA, V. S. Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 3, n. 5, p. 606–618, set. 2011.

SAMY, M. et al. **Bioactive compounds from the leaves of *Eugenia uniflora***. [s.l: s.n.]. v. 7

SANTOS, R. . et al. Seasonal variation in the phenol content of *Eugenia uniflora* L. leaves. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 1, p. 85–89, 2011.

SCHAPOVAL, E. E. et al. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **Journal of ethnopharmacology**, v. 44, n. 3, p. 137–142, dez. 1994.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: Xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 183–186, nov. 1987.

SCHUMACHER, N. S. G. et al. Identification and Antioxidant Activity of the Extracts of *Eugenia uniflora* Leaves. Characterization of the Anti-Inflammatory Properties of Aqueous Extract on Diabetes Expression in an Experimental Model of Spontaneous Type 1 Diabetes (NOD Mice). **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 4, n. 4, p. 662–680, 2015.

SECCO, L. M. DAL; CASTILHO, V. Expenditure survey on continued veno-venous hemodialysis procedure in the intensive care unit. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 15, n. 6, p. 1138–1143, 2007.

SEHAJPAL, J. et al. Role of progesterone in melatonin-mediated protection against acute kidney injury. **The Journal of surgical research**, v. 191, n. 2, p. 441–447, out. 2014.

SENTURK, H. et al. The protective effect of *Hypericum organifolium* in experimental renal ischemia/reperfusion injury in rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 33, p. 2306–2312, 2013.

SETSUKINAI, K. et al. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. **J Biol Chem**, v. 278, n. 5, p. 3170–3175, 2003.

SHELTON, L. M.; KEVIN PARK, B.; COPPLE, I. M. Role of Nrf2 in protection against acute kidney injury. **Kidney International**, v. 84, n. 6, p. 1090–1095, 2013.

SI, Y.-N. et al. Dexmedetomidine protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidney. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 18, n. 13, p. 1843–1851, jul. 2014.

SIMÕES, C. M. O. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. [s.l.] Editora da Universidade, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

SINGH, A. P. et al. Animal models of acute renal failure. **Pharmacological reports : PR**, v. 64, n. 1, p. 31–44, 2012.

SIVARAJAH, A. ET AL. Agonists of Peroxisome-Proliferator Activated ReceptorGamma Reduce Renal Ischemia/Reperfusion Injury. **American Journal of Nephrology**, v. 23, n. 4, p. 267–276, 2003.

STAR, R. A. Treatment of acute renal failure. **Kidney Int**, v. 54, n. 6, p. 1817–1831, 1998.

TATIANA S. FIUZA, MARIA HELENA REZENDE, SIMONE M. T. SABÓIA-MORAIS, MARIA TERESA F. BARA, LEONICE M. F. TRESVENZOL, J. R. DE P. Caracterização farmacognóstica das folhas de. v. V, n. 2, p. 1–11, 2008.

TONINI, C. L. et al. Effects of Aging and Hypercholesterolemia on Oxidative Stress and DNA Damage in Bone Marrow Mononuclear Cells in Apolipoprotein E-deficient Mice. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 2, p. 3325–3342, 2013.

TSUDA, H. et al. Febuxostat suppressed renal ischemia-reperfusion injury via reduced oxidative stress. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 427, n. 2, p. 266–272, out. 2012.

TUCCI JR., S. et al. Calcium channel blocker and renal mitochondrial function in warm renal ischemia. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 31, n. 4, p. 384–389, 2005.

UCHINO, S. et al. An assessment of the RIFLE criteria for acute renal failure in hospitalized patients*. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 7, p. 1913–1917, jul. 2006.

UEDA, M. et al. Effect of catalase-specific inhibitor 3-amino-1,2,4-triazole on yeast peroxisomal catalase in vivo. **FEMS microbiology letters**, v. 219, n. 1, p. 93–98, fev. 2003.

VINHOLES, J.; VIZZOTTO, M. Synergisms in Alpha-glucosidase Inhibition and Antioxidant Activity of *Camellia sinensis* L. Kuntze and *Eugenia uniflora* L. Ethanolic Extracts. **Pharmacognosy research**, v. 9, n. 1, p. 101–107, 2017.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: [s.n.].

WAKABAYASHI, N. et al. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 7, p. 2040–2045, 2004.

WEINBERG, J. M. The cell biology of ischemic renal injury. **Kidney international**, v. 39, n. 3, p. 476–500, 1991.

WU, H.-H. et al. Ischemic conditioning by short periods of reperfusion attenuates renal ischemia/reperfusion induced apoptosis and autophagy in the rat. **Journal of Biomedical Science**, v. 16, n. 1, p. 19, 2009.

YADAV, Y. C.; SRIVASTAVA, D. N. Nephroprotective and curative effects of *Ficus religiosa* latex extract against cisplatin-induced acute renal failure. **Pharmaceutical biology**, v. 51, n. 11, p. 1480–1485, 22 nov. 2013.

YANG, Y. et al. Renoprotective approaches and strategies in acute kidney injury. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 163, p. 58–73, 2016.

ZAHRAN, M. H. et al. Sildenafil activates antioxidant and antiapoptotic genes and inhibits proinflammatory cytokine genes in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury. **Int Urol Nephrol**, v. 47, n. 11, p. 1907–1915, 2015a.

ZAHRAN, M. H. et al. Sildenafil activates antioxidant and antiapoptotic genes and inhibits proinflammatory cytokine genes in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury. **Int Urol Nephrol**, v. 47, n. 11, p. 1907–1915, 16 nov. 2015b.

ZHAO, L. et al. Protective Effect of the Total Flavonoids from *Rosa laevigata*

Michx Fruit on Renal Ischemia-Reperfusion Injury through Suppression of Oxidative Stress and Inflammation. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 952, 2016.

ZOU, C. et al. Pioglitazone protects against renal ischemia-reperfusion injury by enhancing antioxidant capacity. **The Journal of surgical research**, v. 184, n. 2, p. 1092–1095, out. 2013.